

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт Природных Ресурсов
Направление подготовки Химическая технология
Кафедра Физической и Аналитической химии

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

| Тема работы | |
|---|--|
| Получение каллусной культуры <i>Aconitum barbatum</i>, продуцента фармакологически ценных алкалоидов | |

УДК 57.085.23

Студент

| Группа | ФИО | Подпись | Дата |
|--------|-------------------|---------|------|
| 2ДЗВ | Зоригт Дуламсурэн | | |

Руководитель

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|-----------|---------------|------------------------|---------|------|
| Доцент | Чернова А. П. | к.х.н., доцент | | |

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|----------------------------|----------------|------------------------|---------|------|
| Доцент кафедры менеджмента | Рыжакина Т. Г. | к.э.н. | | |

По разделу «Социальная ответственность»

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|-----------------------|----------------|------------------------|---------|------|
| Ассистент кафедры ЭБЖ | Раденков Т. А. | | | |

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

| Зав. кафедрой | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|---------------|-----------------|------------------------|---------|------|
| Профессор | Пестряков А. Н. | д.х.н., профессор | | |

Томск – 2017 г.

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт Природных Ресурсов
Направление подготовки Химическая технология
Кафедра Физической и Аналитической химии

УТВЕРЖДАЮ:
Зав. кафедрой
_____ Пестряков А. Н.
(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

| |
|---------------------|
| Бакалаврской работы |
|---------------------|

Студенту:

| Группа | ФИО |
|--------|--------------------|
| 2ДЗВ | Зоригт Дуламсурэну |

Тема работы:

| | |
|---|------------------------|
| Получение каллусной культуры <i>Aconitum barbatum</i>, продуцента фармакологически ценных алкалоидов | |
| Утверждена приказом директора (дата, номер) | № 2658/с от 20.04.2017 |

| | |
|--|------------|
| Срок сдачи студентом выполненной работы: | 12.06.2017 |
|--|------------|

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

| | |
|--|---|
| Исходные данные к работе <i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i> | Объект исследования – семена <i>Aconitum barbatum</i> Получить каллусную культуру <i>Aconitum barbatum</i> |
|--|---|

| | |
|---|---|
| <p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p> <p>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</p> | <p>Выбрать оптимальные условия для получения каллусной культуры <i>Aconitum barbatum</i>;</p> <p>Получить каллусную культуру технологией <i>in vitro</i> на модифицированной питательной среде МС;</p> <p>Исследовать жизнеспособность каллусной культуры <i>Aconitum barbatum</i>;</p> <p>Определить морфометрические параметры каллусной культуры и исследовать влияние содержания фитогормонов в питательной среде на данные параметры;</p> <p>Выделить сумму алкалоидов из каллусной культуры и растительного сырья <i>Aconitum barbatum</i> методом экстракции;</p> <p>Разделить дитерпеновые алкалоиды на индивидуальные вещества методом ЖКХ на сорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ;</p> <p>Установить содержание алкалоидов в полученной культуре тканей.</p> |
| <p>Перечень графического материала</p> | <p>Диаграммы, фотографии</p> |
| <p>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</p> | |
| <p>Раздел</p> | <p>Консультант</p> |
| <p>Финансовый менеджмент и ресурсоэффективность</p> | <p>Рыжакина Т.Г.</p> |
| <p>Социальная ответственность</p> | <p>Раденков Т. А.</p> |

| | |
|--|--------------------|
| <p>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</p> | <p>09.12.16 г.</p> |
|--|--------------------|

Задание выдал руководитель:

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|-----------------|--------------|------------------------|---------|------|
| Доцент каф. ФАХ | Чернова А.П. | к.х.н, доцент | | |

Задание принял к исполнению студент:

| Группа | ФИО | Подпись | Дата |
|--------|-------------------|---------|------|
| 2ДЗВ | Зоригт Дуламсурэн | | |

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»

Студенту:

| Группа | ФИО |
|--------|-------------------|
| 2ДЗВ | Зоригт Дуламсурэн |

| Институт | ИПР | Кафедра | ФАХ |
|---------------------|----------|---------------------------|-----------------------|
| Уровень образования | Бакалавр | Направление/специальность | Химическая технология |

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

| | |
|--|--|
| 1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих | Приблизительная стоимость ресурсов научного исследования, в том числе научно-технического оборудования, составляет около 300 тыс. руб. |
| 2. Нормы и нормативы расходования ресурсов | В соответствии с ГОСТ 14.322-83 «Нормирование расхода материалов» и ГОСТ Р 51541-99 «Энергосбережение. Энергетическая эффективность» |
| 3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования | Налоги рассчитать по упрощенной системе налогообложения (30% от выручки), ставку дисконтирования принять равной 0,1, |

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

| | |
|--|---|
| 1. Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения | Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения, оценка готовности проекта к коммерциализации |
| 2. Планирование и формирование бюджета научных исследований | Разработка плана проекта (календарный план НИИ), бюджета проекта исследования (планируемые затраты на выполнения НИИ), организационной структуры проекта (выбор организационной структуры научного проекта) |
| 3. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования | Оценка сравнительной эффективности исследования |

Перечень графического материала:

| |
|---|
| 1. Оценка конкурентоспособности технических решений |
| 2. Матрица SWOT |
| 3. График проведения и бюджет НИИ |
| 4. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НИИ |
| 5. Сравнительная эффективность разработки |

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|-------------------------|----------------|------------------------|---------|------|
| доцент каф. менеджмента | Рыжакина Т. Г. | к.э.н. | | |

Задание принял к исполнению студент:

| Группа | ФИО | Подпись | Дата |
|--------|-------------------|---------|------|
| 2ДЗВ | Зоригт Дуламсурэн | | |

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**



Студенту:

| Группа | ФИО |
|--------|-------------------|
| 2ДЗВ | Зоригт Дуламсурэн |

| Институт | ИПР | Кафедра | ФАХ |
|---------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|
| Уровень образования | Бакалавриат | Направление/специальность | Химическая технология |

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

| | |
|--|--|
| <p>1. Описание рабочего места (рабочей зоны, технологического процесса, механического оборудования) на предмет возникновения:</p> <ul style="list-style-type: none"> – вредных проявлений факторов производственной среды (метеоусловия, вредные вещества, освещение, шумы, вибрации, электромагнитные поля, ионизирующие излучения) – опасных проявлений факторов производственной среды (механической природы, термического характера, электрической, пожарной и взрывной природы) – негативного воздействия на окружающую природную среду (атмосферу, гидросферу, литосферу) – чрезвычайных ситуаций (техногенного, стихийного, экологического и социального характера) | <p>Закрытое сухое отапливаемое помещение расположенное на 2 этаже. Научная работа связана с различными видами работ с химическими реактивами, Помещение оснащено вытяжной вентиляцией. Обеспечены санитарно-гигиенические условия, устраняющих производственный травматизм и профессиональные заболевания.</p> |
| <p>2. Знакомство и отбор законодательных и нормативных документов по теме</p> | <p>Федеральный закон № 426-ФЗ от 28 декабря 2013 года «О специальной оценке условий труда». Федеральный закон №184-ФЗ «о техническом регулировании от 27 декабря 2002 года. Федеральный закон № 123-ФЗ от 22.07.2008 г (ред от 10.07 2012г) «Технический регламент о требованиях к пожарной безопасности». ГОСТ 120003-74, СанПиН 2.2.4.548 – 96, ГОСТ Р12.1.019-2009, СНиП II-4-79, ГОСТ 12.1.004-91.</p> |

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

| | |
|--|--|
| <p>1. Анализ выявленных вредных факторов проектируемой производственной среды в следующей последовательности:</p> <ul style="list-style-type: none"> – физико-химическая природа вредности, её связь с разрабатываемой темой; – действие фактора на организм человека; – приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ); – предлагаемые средства защиты (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства) | <p>Приборы и оборудования находится в помещении с нормальным уровнем освещения (люминисцентные лампы с суммарным уровнем освещенности не ниже 300 люкс в соответствии со СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03). Средства защиты: коллективная защита - работа под вытяжным шкафом; индивидуальные средства защиты - халат, респиратор одноразовые перчатки</p> |
| <p>2. Анализ выявленных опасных факторов проектируемой произведённой среды в следующей</p> | <p>При выполнении работ с электроприборами), возможно короткое замыкание</p> |

| | |
|--|---|
| <p><i>последовательности</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – механические опасности (источники, средства защиты); – термические опасности (источники, средства защиты); – электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, молниезащита – источники, средства защиты); – пожаровзрывобезопасность (причины, профилактические мероприятия, первичные средства пожаротушения) | <p>электропроводок (внешние электропроводки с ПВХ изоляцией в ПВХ оболочке). В связи с этим в электрическую цепь установлены автоматические выключатели, имеющие все необходимые механизмы разрыва цепи (электромагнитный, тепловой и др. расцепители), а также в помещении имеется огнетушитель. Все электроприборы заземлены.</p> |
| <p>3. Охрана окружающей среды:</p> <ul style="list-style-type: none"> – анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы); – анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); – анализ воздействия объекта на литосферу (отходы); – разработать решения по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды. | <p>В случае работы с опасными реактивами, они сливаются в специальную емкость «Слив» и утилизируются сторонней организацией.</p> |
| <p>4. Защита в чрезвычайных ситуациях:</p> <ul style="list-style-type: none"> – перечень возможных ЧС на объекте; – выбор наиболее типичной ЧС; – разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; – разработка мер по повышению устойчивости объекта к данной ЧС; – разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий | <p>Возможные ЧС: пожар, взрыв, разрушение зданий в результате разрядов атмосферного электричества, ураган, землетрясение. Наиболее актуальная ЧС – возникновение пожара. Для его ликвидации необходимо использовать огнетушитель, песок, асбестовое одеяло.</p> |
| <p>5. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</p> <ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны | <p>Каждому работающему с химическими веществами выдаются средства индивидуальной защиты. Проводятся инструктажи, обучения. Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны: технический перерыв, полная изоляция от производственных источников шума и вибрации.</p> |

| | |
|--|--|
| Дата выдачи задания для раздела по линейному графику | |
|--|--|

Задание выдал консультант:

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|-----------------------|---------------|------------------------|---------|------|
| Ассистент кафедры ЭБЖ | Раденков Т.А. | | | |

Задание принял к исполнению студент:

| Группа | ФИО | Подпись | Дата |
|--------|-------------------|---------|------|
| 2ДЗВ | Зоригт Дуламсурэн | | |

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 106 с., 25 рисунков, 38 таблиц, 63 источников, 3 приложения.

Ключевые слова: каллусная культура, дитерпеновые алкалоиды, ткани культур, Aconitum barbatum, технология in vitro

Объектом исследования является растение Aconitum barbatum

Цель работы – получить каллусную культуру Aconitum barbatum

В процессе исследования проводились выбор оптимальных условий для получения каллусной культуры, определение жизнеспособности каллусной культуры, выделение суммы алкалоидов из каллусной культуры и растительного сырья, разделение суммы алкалоидов на индивидуальные вещества.

В результате исследования были подобраны оптимальные условия для получения каллусной культуры Aconitum barbatum, определена жизнеспособность каллусной культуры, была получена сумма алкалоидов из каллусной культуры и растительного сырья, разделены дитерпеновые алкалоиды на индивидуальные вещества с помощью жидкостной колоночной хроматографии.

Степень внедрения: данная работа находится на стадии научного исследования

Область применения: фармацевтическая промышленность, медицина

В будущем планируется получить суспензионную культуру Aconitum barbatum, выделить из суспензионной культуры сумму алкалоидов, разделить дитерпеновые алкалоиды на индивидуальные вещества и идентифицировать полученные алкалоиды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МС – питательная среда Мурасиге и Скуга

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

ЖКХ – жидкостная колоночная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ТСХ – тонкослойная хроматография

НУК – 1- нафтилуксусная кислота

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

2,4-Д – 2,4 - дихлорфеноксиуксусная кислота

БАП – 6-бензиламинопурин

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 12 |
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 15 |
| 1.1 Сведения об аконите бородатом (<i>Aconitum barbatum</i>)..... | 15 |
| 1.1.1 Аконит бородатый: морфология, распространение..... | 15 |
| 1.1.2 Фармакологические свойства <i>Aconitum barbatum</i> и его препаратов... | 18 |
| 1.1.3 Химический состав <i>Aconitum barbatum</i> | 20 |
| 1.1.4 Характеристика биологически активных веществ, содержащихся в <i>Aconitum barbatum</i> | 20 |
| 1.2 Алкалоиды <i>Aconitum barbatum</i> | 23 |
| 1.3 Биотехнологические методы исследования..... | 25 |
| 1.3.1 Методы культивирования семян, изолированных клеток и тканей растений..... | 25 |
| 1.3.2 Культивирование каллусных тканей на твердых питательных средах.. | 29 |
| 1.4 Методы выделения алкалоидов | 31 |
| 1.4.1 Методы разделения алкалоидной смеси и выделение индивидуальных веществ..... | 32 |
| ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 34 |
| 2.1 Объект исследования..... | 34 |
| 2.2 Приготовление питательной среды и вспомогательных растворов..... | 35 |
| 2.2.1 Питательная среда Мурасиге и Скуга..... | 36 |
| 2.2.2 Стерилизующий раствор..... | 37 |
| 2.2.3 Приготовление раствора гормонов..... | 37 |
| 2.3 Методика стратификации семян <i>Aconitum barbatum</i> | 37 |
| 2.4 Методика получения каллусной культуры <i>Aconitum barbatum</i> | 38 |
| 2.5 Методика выделения суммы алкалоидов из растительного сырья и каллусных культур..... | 38 |
| 2.6 Методика разделения суммы алкалоидов на индивидуальные вещества..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 2.7 Фиксация каллусной культуры | 39 |
| 2.8 Мацерация каллусной культуры | 39 |
| 2.9 Методики обработки полученных данных..... | 41 |
| 2.9.1 Построение кривых роста..... | 41 |
| 2.9.2 Определение жизнеспособности культуры | 41 |
| 2.9.3 Определение размеров растительных клеток | 42 |
| 2.9.3.1 Измерение объема клеток под микроскопом..... | 42 |
| 2.9.3.2 Расчет объема клеток..... | 42 |
| ГЛАВА 3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 45 |
| 3.1 Получение растения технологией <i>in vitro</i> | 45 |
| 3.2 Индукция каллуссообразования..... | 47 |
| 3.3 Жизнеспособность каллусной культуры..... | 50 |
| 3.4 Выделение суммы алкалоидов из растительного сырья и культуры ткани..... | 56 |
| ГЛАВА 4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ..... | 61 |
| 4.1 Общая характеристика НИР..... | 61 |
| 4.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения..... | 62 |
| 4.3 SWOT-анализ | 63 |
| 4.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации..... | 66 |
| 4.5 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования..... | 67 |
| 4.6 Инициация проекта..... | 68 |
| 4.7 Организационная структура проекта..... | 68 |
| 4.8 Планирование управления научно-техническим проектом..... | 69 |
| 4.8.1 Контрольные события проекта..... | 70 |
| 4.8.2 План проекта..... | 71 |

| | |
|---|-----|
| 4.9 Бюджет научного исследования..... | 72 |
| 4.9.1 Расчет материальных затрат НТИ..... | 72 |
| 4.9.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ | 73 |
| 4.9.3 Расчет основной заработной платы..... | 74 |
| 4.9.4 Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)..... | 75 |
| 4.9.5 Накладные расходы..... | 76 |
| 4.9.6 Формирование бюджета затрат НТИ..... | 77 |
| 4.10 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.... | 77 |
| ГЛАВА 5 СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ..... | 80 |
| 5.1 Анализ вредных и опасных факторов..... | 80 |
| 5.2 Микроклимат..... | 83 |
| 5.3 Освещенность..... | 85 |
| 5.3.1 Выбор осветительных приборов..... | 85 |
| 5.4 Виброакустические факторы..... | 86 |
| 5.5 Электробезопасность..... | 87 |
| 5.6 Техника безопасности при проведении эксперимента..... | 88 |
| 5.7 Охрана окружающей среды..... | 89 |
| 5.8 Требования безопасности в аварийных ситуациях..... | 89 |
| 5.9 Пожарная безопасность..... | 90 |
| 5.10 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности..... | 92 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 93 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 96 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А..... | 102 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б..... | 103 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ В..... | 105 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В настоящее время одним из серьёзных проблем медицины являются онкологические заболевания. Для лечения этих заболеваний необходимы лекарственные препараты, содержащие алкалоиды.

На сегодняшний день, несмотря на широкий спектр имеющихся лекарственных препаратов из растений, многие представители флоры не нашли должного применения в медицине. В этом отношении особый интерес представляет изучение растений, содержащих алкалоиды, которые обладают разносторонней биологической активностью.

Использование лекарственных растений в качестве сырья ограничено сезонностью и ареалом произрастания. А также тенденция современной медицины к использованию лекарственных препаратов натурального происхождения с каждым годом увеличивается. Поэтому разработка методов получения ценных вторичных метаболитов с помощью культивирования растительных клеток и тканей технологией *in vitro* является актуальной задачей.

Объектом исследования было выбрано растение *Aconitum barbatum*. *Aconitum barbatum* является представителем флоры Сибири, Монголии и Китая, применяется в народной медицине в качестве обезболивающего, противовоспалительного, противоопухолевого, противовирусного и жаропонижающего средств. Народы Сибири использовали его при лечении рака желудка, при простудных заболеваниях, эпилепсии, псориазе.

Согласно сведениям народной и научной медицины, фармакотерапевтическую активность *Aconitum barbatum* обуславливают дитерпеновые алкалоиды, которые обладают противоопухолевыми свойствами.

Цель исследования

Целью данной работы является получить каллусную культуру *Aconitum barbatum*.

Задачи исследования

1. Выбрать оптимальные условия для получения каллусной культуры *Aconitum barbatum*
2. Получить каллусную культуру технологией *in vitro* на модифицированной питательной среде МС;
3. Исследовать жизнеспособность каллусной культуры *Aconitum barbatum*;
4. Определить морфометрические параметры каллусной культуры и исследовать влияние содержания фитогормонов в питательной среде на данные параметры;
5. Выделить сумму алкалоидов из каллусной культуры и растительного сырья *Aconitum barbatum* методом экстракции;
6. Разделить дитерпеновые алкалоиды на индивидуальные вещества методом ЖКХ на сорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ;
7. Установить содержание алкалоидов в полученной культуре тканей.

Научная значимость и новизна результатов

Впервые получена каллусная культура *Aconitum barbatum* на основе модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга. Подобраны оптимальные условия для получения каллусной культуры *Aconitum barbatum*.

Научно-практическая ценность работы

Из дитерпеновых алкалоидов *Aconitum barbatum* перспективными являются представители атизиновой группы: зонгорин, напеллин и лаппаконитин, обладающие низкой токсичностью и высокой фармакологической активностью.

Результаты полученных экспериментальных исследований могут лечь в основу разработки нового лекарственного препарата, на основе дитерпеновых алкалоидов *Aconitum barbatum*, для лечения заболеваний воспалительного и онкологического характера.

Реализация и апробация работы

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на 10-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» 24-26 мая 2017 г. в г. Бийске на базе Бийского технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова»

Публикации

Результаты проведенных исследований отражены в 1 печатной работе.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Сведения об аконите бородатом (*Aconitum barbatum*)

1.1.1 Аконит бородатый: морфология, распространение

Аконит (*Aconitum*) – представитель семейства Лютиковых (*Ranunculaceae*) [1]. Название растения происходит, от древнегреческого города Аконе, в окрестностях которого эти цветы росли в изобилии [2].

Род аконитов насчитывает до 300 видов [3]. В России встречается около 90 видов аконитов, из них на территории Дальнего Востока – 38 [4], Сибири – 30 [5]. Большая часть аконитов распространена в умеренной зоне Азии, Северной Америке и Европы. Наибольшая популяционная численность и видовое разнообразие аконита в дикой природе наблюдается в азиатском регионе (Китай, Дальний Восток, Алтай, Казахстан) [6].

В настоящее время род аконита делят на четыре секции: *Lycocotnum*, *Antora*, *Napellus*, *Catenatae*. Секции отличаются по окраске цветков, по высоте его шлема, по числу листовок и, главным образом, по корневой системе. Так, у видов секции *Lycocotnum* – сплошной стержневой корень, состоящий из многочисленных волосовидных корней, отходящих от одной плоской и перекрученной корневой пластинки. Цветки имеют высокий шлем, высота которого в 2 – 4 раза превышает его ширину, с желтыми, синими и белыми цветками. Данная секция менее ядовита и предположительно является исходной в эволюции жизненных форм аконитов. К этой секции относятся: аконит Северный, аконит Восточный, аконит Крылова, аконит Бородатый, аконит Белоустый, аконит Тенелюбивый и др.[7].

Акониты секции *Antora* имеют желтые цветки, шлем низкий куполообразный, ширина его на уровне носика равна высоте. К этой секции относятся аконит противоядный и аконит Комарова. Виды этой секции не ядовиты [8].

Представители секций *Napellus* и *Catenatae* различаются лишь количеством корнеклубней у одного растения (в первом случае 2 – 3 клубня, во

втором – цепочка). По этой причине, эти две секции часто сводят в одну – *Napellus* [9]. Цветки синие, фиолетовые, реже белые с низким куполообразным шлемом, ширина его равна высоте. Сюда входит аконит байкальский (аконит Чекановского), также аконит Фишера, аконит разнолистный, аконит японский, аконит Кузнецова, аконит джунгарский, аконит носатый, аконит ядовитый, аконит выющийся и многие другие виды [10].

Аконит, или Борец бородатый (лат. *Aconitum barbatum*)



Рисунок 1 – Аконит бородатый

Аконит бородатый является многолетним травянистым растением, относится к роду Борец (*Aconitum*), семейству Лютиковые (*Ranunculaceae*) [11]. Морфологические особенности данного растения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Морфологические особенности [12]

| | |
|-----------|--|
| Корневище | длинное, ветвистое, образованное плотно сросшимися шнуровидными мочками |
| Стебель | прямой, 50—120 см высотой, прижато пушистый, реже почти голый, при основании вместе с листовыми черешками покрыт курчавыми, обращенными вниз волосками |
| Листья | округлые или почковидные, длиной от 6 до 13 см, шириной от 10 до 16 см, на верхней стороне с короткими, |

| | |
|--------|---|
| | на нижней с более длинными волосками, глубоко разделённые на широко или узколанцетные зубчатые дольки |
| Цветки | Серо-жёлтые, на коротких цветоножках, снабжённых двумя нитевидными прицветничками |
| Семена | трёхгранные, с одним продольным плёчатым крылом |

Аконит растет на любых окультуренных почвах, кроме каменистых и песчаных. Почва должна быть очень воздухопроницаемой, дренированной, питательной, увлажненной. Сильного переувлажнения аконит не переносит. В естественных условиях аконит растет во влажных смешанных лесах.

При малейшем неблагополучии (яркое солнце или застой влаги в почве) листья аконита чернеют. Аконит может расти на открытых освещенных участках, но лучшего цветения от него можно добиться в легкой ажурной полутени садовых деревьев [12].

Распространение и экология

Родиной *Aconitum barbatum* является юг Восточной Сибири, Западная Сибирь, Амурская область, Монголия, северо-восток Китая.

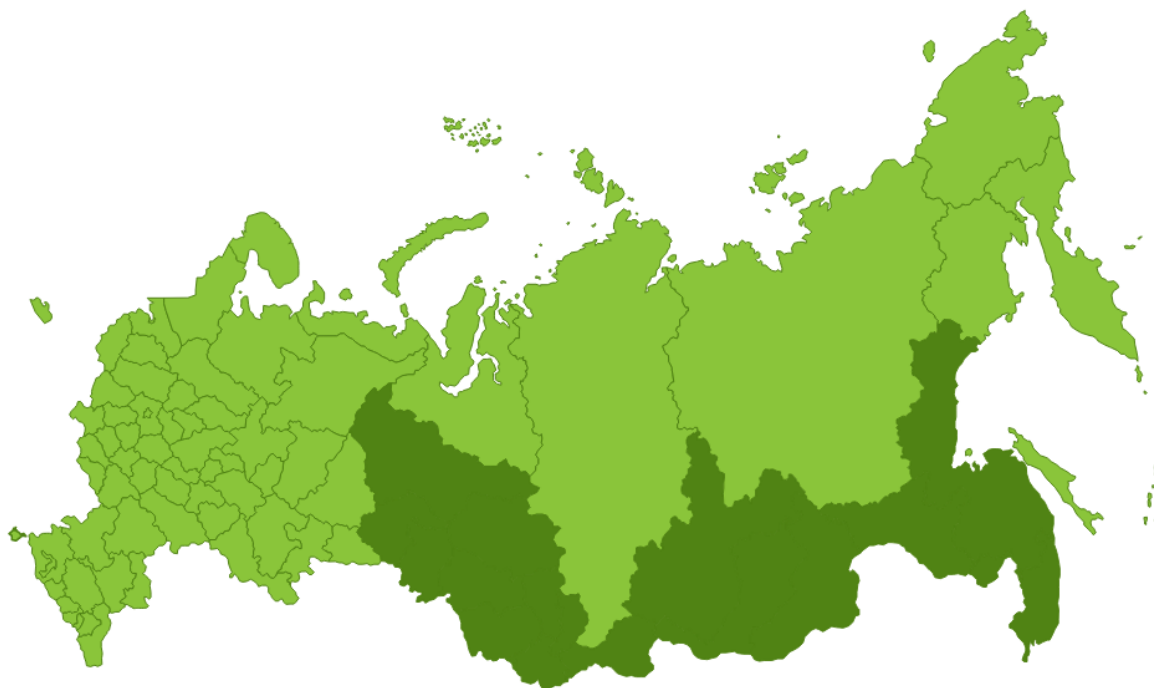


Рисунок 2 – Регионы распространения *Aconitum barbatum* на карте России ■

Данное растение произрастает на степных, реже суходольных лугах, луговых, иногда щебнистых или каменистых склонах, по лесным опушкам, кустарникам, на горах, изредка в негустых лесах.

Для лекарственных целей используются все части растения. Сбор надземной части проводят в июне-июле. В это же время собирают и яркие цветы, которые тоже оказывают лечебное действие [13].

1.1.2 Фармакологические свойства *Aconitum barbatum* и его препаратов

Ещё в начале XVIII века венский врач Антон Штерк (1731-1803) уделил наиболее пристальное внимание акониту, как противораковому средству. Он являлся первым врачом, проводившим подтвержденные документально научные исследования ядовитого растения. Штерк опытным путем устанавливал оптимальную дозу аконита для лечения злокачественных опухолей и предельно допустимую дозу для человека.

В 1869 году в журнале «Ланцет» появилась большая статья о гомеопатическом лечении рака с помощью аконита. Авторами были приведены несколько случаев выздоровления пациентов с онкологическими заболеваниями, принимавших настойку аконита.

Т. В. Закаурцева, онколог с 35-летним стажем является первым советским врачом, обратившим пристальное внимание на аконит. В период с 1953 по 1988 год ею проводилось исследование терапевтических свойств аконита, результатом которого стала уникальная методика лечения рака. Сначала Закаурцева подвергала больного длительной терапии настойкой аконита, а затем, когда опухоль уменьшалась в размерах и локализовалась, проводила хирургическое удаление. Для закрепления эффекта и страховки от метастаз курс лечения настойкой повторялся. Таким способом ей удалось вылечить несколько десятков пациентов, в том числе, находившихся на второй и третьей стадиях рака [14].

Аконитин по способу воздействия на нервную систему человека схож с ядом кураре. Поэтому при попадании повышенной дозы этого алкалоида в организм наступает смерть в результате паралича дыхательного центра. С лечебной целью используются только мизерные дозы аконитина. Следует отметить, что мизерная доза аконитина нормализует сердечный ритм и дыхание, активизирует клеточный обмен, препятствует размножению инфекций и угнетает рост новообразований. А в больших дозах этот алкалоид приводит к удушью, параличу сердечной мышцы и гибели.

После приема внутрь воды с растворенной в ней настойкой аконита у человека наблюдается повышенное слюноотделение. Это связано с тем, что алкалоид раздражает парасимпатический нерв при всасывании через слизистую оболочку рта. А также в первые часы после приема несколько снижается температура тела [15].

Настой и отвар травы в Сибири использовали как болеутоляющее средство при гастралгии и ревматических болях, как ускоряющее сращивание костей при переломах и противоглистное средство.

Только при регулярном приеме алкалоида можно добиться выраженного лечебного эффекта. Вещество должно накопиться в организме и вызвать иммунный ответ. После этого защитные силы активизируются, и человеческий организм начнет бороться с болезнью. При лечении следует учитывать, что спиртовой настой аконита действует в два раза сильнее, чем отвар [16].

Необходимо понимать, что ядовиты именно растения, содержащие аконитин и его подтипы. Атизиновые алкалоиды не представляют для человека опасности, но в природе очень мало видов аконита, имеющего в составе только эти неядовитые вещества. Большинство растений в той или иной степени обладают токсическими свойствами, так как содержит смесь нескольких алкалоидов [17].

Широкий спектр фармакологических свойств связан с особенностью химического состава данного растения.

1.1.3 Химический состав *Aconitum barbatum*

В литературных источниках приводятся данные о том, что основные фармакотерапевтические свойства *Aconitum barbatum* определяется совокупностью алкалоидов, входящих в его состав [18]. Было интересным провести анализ литературных данных о наличии фармакологических эффектов у отдельных алкалоидов, входящих в состав *Aconitum barbatum*.

Из наземной части (листья, стебель) *Aconitum barbatum* выделены такие дитерпеновые алкалоиды, как: зонгорин, напеллин, лаппаконитин, N-окись 12-эпинапеллин, мезаконитин, а также флавоноиды и жирное масло 37% [19].

Алкалоиды (от лат. *alkali* – щелочь или араб. *alqali* – растительная зола и др. греч. εἶδος – вид, облик) – группа азотсодержащих органических гетероциклических соединений растительного происхождения, большинство из которых обладает свойствами слабого основания [20].

Кроме алкалоидов в состав *Aconitum barbatum* входят макро- и микроэлементы. Их содержание в 1 г сырья приведено ниже.

Макроэлементы (мг/г): К-16,3; Са-11; Mg-2,7; Fe-0,4;

Микроэлементы (мкг/г): Mn-73,3; Cu-11,3; Zn-58,5; Mo-0,4; Сг-0,32; Al-512,8; Ва-54,88; V-1,04; Se-0,11; Ni-4,0; Sr-280,8; РЬ-0,88; В-60,8; I-0,9.

Конечно же, наиболее интересны и важны в составе аконита алкалоиды, сообщающие ему индивидуальные видовые свойства [21].

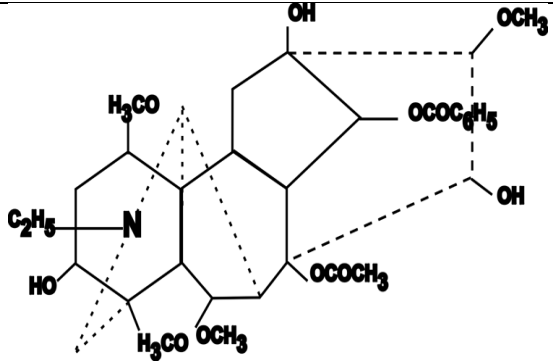
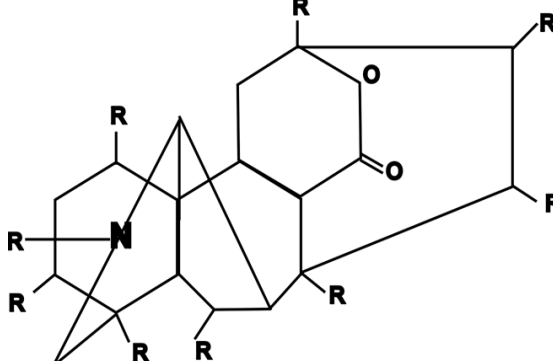
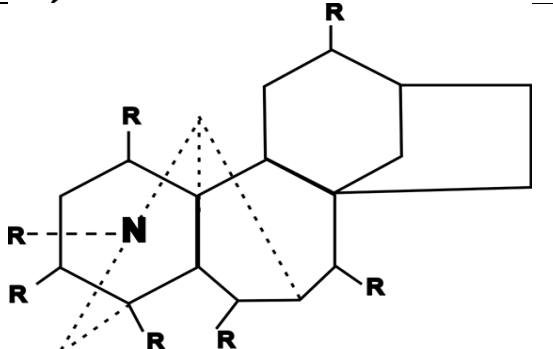
1.1.4 Характеристика биологически активных веществ, содержащихся в *Aconitum barbatum*

Впервые алкалоиды аконита были открыты французским химиком Пешье в 1820 году. Однако, в чистом виде аконитин – самый первый и ярчайший представитель алкалоидов аконита – был выделен в 1838 году немецкими токсикологами Гейгером и Гессе. А через сто лет японский химик Майима определил, что европейские и японские акониты содержат в своем

составе смесь трех кристаллических алкалоидов - аконитина, мезаконитина и гипаконитина, отличающихся только радикалами в химической формуле [22].

Фармакологическая активность алкалоидов изменяется в зависимости от химической структуры. По химической структуре все алкалоиды аконита делятся на три группы (Таблица 2).

Таблица 2 — Классификация алкалоидов аконита

| Группы алкалоидов | Структурная формула | Примеры |
|---------------------|--|---|
| Аконитиновый тип |  | аконитин, лаппаконитин, мезаконитин, акомонин, караколин, талатизамин, иезаконитин, гипаконитин, метилликаконитин |
| Гетератизиновый тип |  | гетератизин, б-бензоилгетератизин |
| Атизиновый тип |  | анторин, псевдоанторин, зонгорин, ацетилзонгорин, атизин (C ₂₂ -H ₃₁ -NO ₁₁) |

1. Аконитиновый тип

Все алкалоиды данной группы имеют в структуре основание, связанное у различных видов аконита с остатками разных органических кислот (уксусной, бензойной, янтарной и др.) - аконин. Примечательно, что аконин является антагонистом аконитина.

Стоит отметить, что алкалоиды аконитиновой группы являются наиболее ядовитыми, значительно отличаются по силе кардиотоксического и обезболивающего действия, что связано с различиями в химическом строении, наличием и видом радикалов у атомов углерода. Примером могут служить аконитин и лаппаконитин, относящиеся к одной группе и сильно отличающиеся по силе действия и терапевтической широте.

2. Атизиновый тип

Алкалоиды этой группы содержат пергидрофенантреновое ядро. В отличие от предыдущих групп эти алкалоиды не ядовиты и имеют кольцеобразную молекулярную структуру. Атизиновые алкалоиды являются моно- и диэфирами бензойной и уксусной кислот. Они содержатся в аконите в очень малых количествах, и оказывают благотворное воздействие на сердечнососудистую систему человека. Представители: анторин, псевдоанторин, зонгорин, ацетилзонгорин, атизин [23].

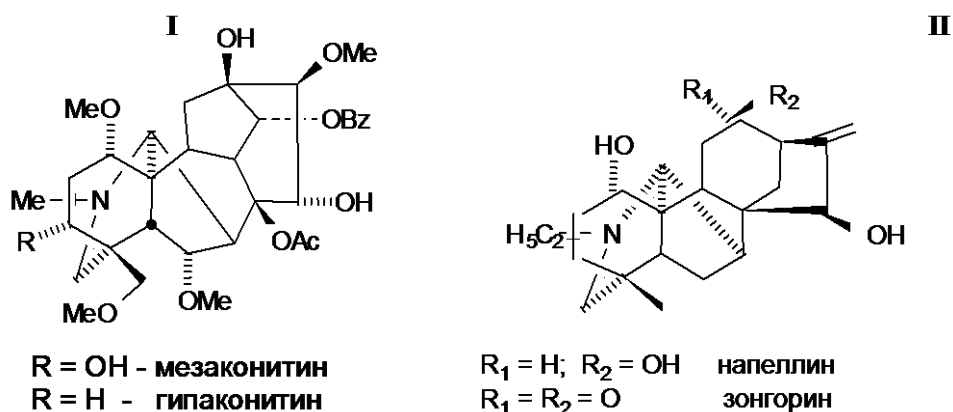


Рисунок 2 – Структурные формулы дитерпеновых алкалоидов:

I – аконитинового типа: мезаконитин; гипаконитин;

II – атизинового типа: напеллин; зонгорин

Процентное содержание алкалоидов в различных частях растения зависит от нескольких причин [24]:

- от фазы вегетации;
- от условий произрастания аконита;
- от вида.

Обнаружено, что наибольшее количество алкалоидов в зеленой части растения содержится весной в молодых побегах, а также в период бутонизации. В клубнях также больше всего алкалоидов ранней весной до активного развития стебля, либо поздней осенью, когда растение отцветает.

Считается, что больше всего алкалоидов содержат акониты, растущие на восточных и северных склонах гор, а также в тени, в распадках сопок [25].

Так, акониты гириный (3,5%) и Кузнецова (0,25%) отличаются друг от друга по содержанию алкалоидов в 14 раз [26]. При этом на первом месте по содержанию ядовитых алкалоидов (в большей мере, псевдоаконитина, в 2 раза) стоит индийский аконит (ассоциируемый с *A. ferox* или *A. laciniatum*) [27].

1.2 Алкалоиды *Aconitum barbatum*

В стеблях, листьях, цветах и корнях аконита содержится два вида алкалоидов, общее описание которых представлено в предыдущем пункте.:

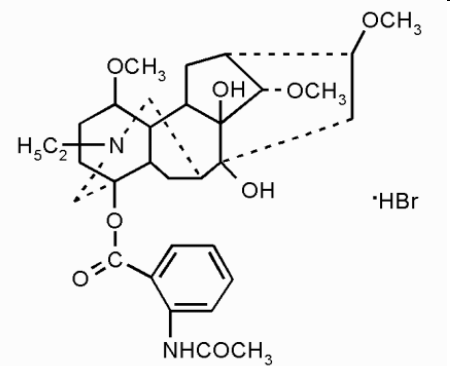
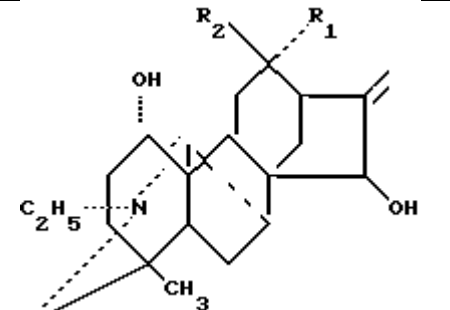
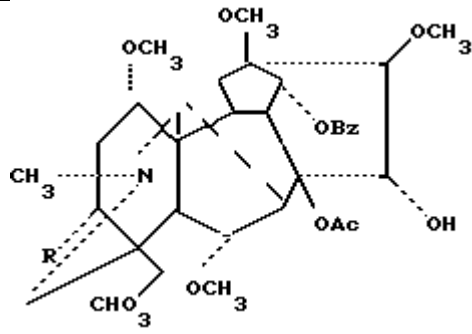
1. Атизиновые;
2. Аконитиновые.

В период цветения наземная часть содержит до 2% алкалоидов (аконитин и псевдоаконитин), корни - до 0,3%, корневища 1,05-1,34%, цветки – 2,0-2,4%, семена - 1,5-1,71%. Из наземной части (листья, стебель) выделены: алкалоиды: зонгорин, напеллин, лаппаконитин, N-окись 12-эпинапеллин и мезаконитин [28].

Аконитовые алкалоиды обладают высокой физиологической активностью, благодаря этому, препараты, приготовленные из этих алкалоидов, применяются в медицине.

В таблице 3 представлены фармакологические свойства основных алкалоидов *Aconitum barbatum*. Общими для большинства алкалоидов *Aconitum barbatum* являются противоопухолевые и противометастатические свойства. Однако применение в современной медицине нашли препараты, содержащие алкалоиды лаппаконитин [29].

Таблица 3 – Основные алкалоиды *Aconitum barbatum* [30]

| Структурная формула | Название | Свойства | Препараты |
|---|--|--|--------------------------------------|
|  | Лаппаконитин | Антиаритмические, противоопухолевые, противометастатические | Лаппаконитина гидробромид, аллапинин |
|  | R1=OH, R2=H – напеллин R1+R2=O – зонгорин | Противоопухолевые, противометастатические, антиаритмические, анестетические (напеллин - наименее токсичный) | - |
|  | R=OH - мезаконитин R=H - гипаконитин | Противоопухолевые, противометастатические (мало изучены, возможно, дают эффект в сочетании) | - |

1.3 Биотехнологические методы исследования

1.3.1 Методы культивирования семян, изолированных клеток и тканей растений

Культивирование изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (технология *in vitro*) называется методом культуры изолированных тканей, требующий особых асептических условий.

Для культивирования частей ткани или органов растения – эксплантов, а тем более отдельных клеток требуется соблюдение полной асептики. Это связано с тем, что микроорганизмы, попав в питательную среду, выделяют токсины, замедляющие рост клеток и приводящие культуру к гибели. Поэтому необходимо соблюдать определённые правила асептики в асептических комнатах или в ламинарном боксе при всех операциях с клетками и тканями при культивировании *in vitro*. [31].

Изолированные клетки и ткани выращивают на питательных средах. Эти среды содержат все необходимые растениям макро- и микрокомпоненты, витамины, углеводы и фитогормоны. Необходимость использования углеводов в качестве питательного компонента связано с тем, что большинство каллусных тканей не содержат хлорофилл и неспособны к автотрофному питанию. Концентрация углеводов (сахароза или глюкоза), входящих в состав питательной среды, составляет 2-3%. Ауксины и цитокинины являются обязательными компонентами питательных сред. Ауксины вызывают дедифференцировку клеток экспланта, а цитокинины индуцируют клеточные деления. Процессы роста и вторичного метаболизма значительно снижаются при истощении среды. Для приготовления твёрдых питательных сред при культивировании каллусных тканей применяют агар. В настоящее время для культивирования растительных тканей применяют большое число различных по составу питательных сред (Таблица 4). [32]

Таблица 4 – Состав различных питательных сред для культивирования тканей растений [33]

| Компоненты | Концентрация компонентов в среде, мг/л | | | |
|---|--|-------|-------|-------|
| | МС | Уайта | Нича | В5 |
| Маточный раствор макроэлементов | | | | |
| NH_4NO_3 | 1650 | - | 720 | - |
| KNO_3 | 1900 | 80 | 950 | 2500 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 440 | - | - | 150 |
| CaCl_2 | - | - | 166 | - |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 370 | 750 | 185 | 250 |
| KH_2PO_4 | 170 | - | 68 | - |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | - | - | - | 134 |
| Na_2SO_4 | - | 200 | - | - |
| Маточный раствор микроэлементов | | | | |
| KJ | 0,83 | 0,75 | - | 0,75 |
| H_3BO_3 | 6,2 | 1,5 | 10 | 3 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 22,3 | 5 | 25 | - |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 8,6 | 3 | 10 | 2 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 | - | 0,25 | 0,25 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 | 0,01 | 0,025 | 0,025 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 | - | - | 0,025 |
| Маточный раствор хелатного железа | | | | |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27,8 | - | 27,8 | 27,8 |
| $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 37,3 | - | 37,3 | 37,3 |
| Витамины и органические вещества | | | | |
| Инозит | 100 | - | 100 | 100 |
| Биотин | - | - | 0,05 | - |
| Никотиновая кислота | 0,5 | 0,5 | 5 | 1 |
| Пиридоксин-НСl | 0,5 | 0,01 | 0,5 | 1 |
| Тиамин-НСl | 0,1 | 0,01 | 0,5 | 10 |
| Глицин | 2 | 3 | 2 | - |
| Фолиевая кислота | - | - | 0,5 | - |
| Сахароза | 30000 | 20000 | 20000 | 20000 |

Среда Мурасиге и Скуга является самой универсальной. Данная среда пригодна для образования каллуса, поддержания неорганизованного роста каллусных тканей, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. К образованию корней (преобладание ауксина), стеблевых культур (преобладание кинетина) приводит изменение соотношения ауксина и кинетина. Для выращивания каллусных клеток и тканей бобовых растений и злаков чаще используют среду Гамборга и Эвелеге (В5), среда Уайта обеспечивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после

регенерации, а среда Нича хорошо подходит для андрогенеза в культуре пыльников [34].

Дедифференцировка - основа каллусогенеза

Культура изолированных тканей представляют собой каллусные и гораздо реже опухолевые ткани. Образование каллусной ткани происходит на целых растениях в результате повреждения, а также на эксплантах (фрагментах ткани или органа, используемых для получения первичного каллуса) в стерильной культуре. Процесс образования каллуса происходит вследствие неорганизованного деления (пролиферации) дедифференцированных клеток.

В процессе дифференцировки клетки теряют способность к делению. Возвращение клеток в меристематическое состояние, при котором они сохраняют способность делиться, называется дедифференцировка. Дедифференцировка и индукция каллусогенеза у интактных растений происходят при механическом повреждении вследствие образования раневых гормонов (травматиновая кислота). Обязательным условием, помимо повреждения, дедифференцировки тканей экспланта и превращения их в каллусные клетки является наличие ауксинов и цитокининов. В качестве ауксинов чаще всего используют 2,4-Д, ИУК и НУК, причем максимальную активность проявляет 2,4-Д. В качестве цитокининов при приготовлении искусственных питательных сред обычно используют 6-БАП, зеатин и кинетин. Хотя эти две группы гормонов проявляют разные функции в каллусогенезе, они тесно связаны между собой. Ауксины инициируют процессы дедифференцировки клетки, подготавливают ее к процессу деления. После чего цитокинины вызывают деление клеток. Таким образом, вследствие дедифференцировки, т. е. восстановления у нее способности к делению, специализированная клетка растительной ткани становится каллусной. [35]

Так, на процесс каллусообразования и выход алкалоидов большое влияние оказывает выбор питательной среды и условий культивирования. На основе литературных данных был проведен сравнительный анализ условий культивирования различных культур (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнительный анализ условий культивирования [36, 37, 38]

| Культура | Питательная среда | Условия культивирования | Алкалоиды |
|-----------------------------------|--|---|--|
| Catharanthus roseus L.DON | Мурасиге-Скуга, 6-БАП (1 мг/л) и НУК (10 мг/л) | 1) Стандартная МС с концентрациями сахарозы – 1, 3, 5 и 7% , 32 сут при $t=25^{\circ}\text{C}$, освещенности 3000 лк, фотопериод – 8 ч день, 16 ч ночь. 2) Стандартная МС с концентрациями гидролизата казеина и инозита, мг/л – 100, 300, 900 и 4500 , 32 сут при $t=30^{\circ}\text{C}$, освещенности 3000 лк, фотопериод – 8 ч день, 16 ч ночь. | Винкристин, винбластин, лейрозин (димерные индольные алкалоиды). 1) Оптимальной концентрацией сахарозы признана 5%. 2) При повышенном содержании гидролизата казеина наблюдается увеличение выхода алкалоидов. |
| Aconitum septentrionale Koelle | Мурасиге-Скуга | 1) Стандартная МС + 2,4Д + НУК 2) Стандартная МС + 2,4Д + 6-БАП 3) Стандартная МС + 2,4Д Во время культивирования на свету на порядок повышается жизнеспособность каждого следующего пассажа. | Лаппаконитин (дитерпеновый алкалоид). Наибольшая доля эксплантов, образовавших каллус, выделена из листьев. 1) 92,9%; 2) 93,1%; 3) 97% Содержание алкалоида в каллусе, образованном из листьев, выше. Концентрация – примерно 0,0002%. |
| Stephania glabra | Мурасиге-Скуга, витамины по прописи Стаба | Стандартная МС + НУК 0,5 мг/л + 2,4-Д 1,0 мг/л + Са-пантотенат + тиамин (или пиридоксин) по 2 мг/л + сахароза 50 мг/л (суспензионное культивирование) | Стефарин (изохинолиновый алкалоид). В 3 – 3,5 раза увеличивается выход стефарина, сокращается время оптимального нарастания каллуса и накопления алкалоида. |

На основании проанализированных данных можно сделать следующие выводы:

1) В большинстве опытов подчеркивается влияние углеводов (сахарозы или пищевого сахара) на накопление каллусной ткани и выход алкалоидов. Оптимальной концентрацией сахарозы в среде признана 5%. Именно при такой концентрации повышается выход алкалоидов. Концентрация выше 7% признана губительной для тканей, ниже 3% - тоже.

2) Содержание алкалоидов выше в том каллусе, который образован от листьев экспланта.

3) Для накопления каллусной ткани и ее дифференцировки (известно, что вторичный метаболизм наблюдается в дифференцированных тканях) наиболее всего подходит МС с добавлением НУК 1 мг/л и кинетина 0,5 мг/л. Синтез вторичных метаболитов начинается под влиянием 2,4-Д с оптимальной концентрацией 1,0 мг/л. Можно предположить, что увеличение концентрации 2,4-Д может положительно повлиять на выход алкалоидов.

4) Отмечается положительное влияние света на формирование и продуктивность каллуса и суспензионных культур.

5) В работе «Изучение каллусной ткани *Aconitum septentrionale*» отмечается, что серьезные сложности в получении каллусной ткани аконита северного связаны с тем, что во время культивирования в ней активно накапливаются полифенольные соединения, что отрицательно сказывается на росте биомассы и ее жизнеспособности.

1.3.2 Культивирование каллусных тканей на твердых питательных средах

При культивировании этим способом используются твердые питательные среды, которые содержат гелеобразующий компонент. В качестве такого компонента чаще всего используется агар, так как он является наиболее близким по природе субстратом растительного происхождения. Агаризованная среда представляет собой плотный гель, на поверхности которого находятся каллусные клетки [39]. Для получения каллусных культур на поверхность питательной среды помещают эксплант (небольшие части тканей разных органов высших растений). Первичный каллус (масса недифференцированных клеток) образуется через 4-6 недель культивирования экспланта. Затем первичный каллус необходимо разделить и перенести на свежую питательную среду. Каллусная ткань, образовавшийся на агаризованной среде, представляют

собой рыхлую аморфную структуру белого или желтоватого цвета в виде массы тонкостенных клеток. Данный способ культивирования обычно используется в лабораторных условиях для получения изолированных культур растений, предварительной оценки культур в качестве возможных продуцентов БАВ, а также для выращивания посевного материала. В течении 4-6 недель среда истощается, поэтому для дальнейшего культивирования необходимо производить пересев. В противном случае ткани могут погибнуть.

Высшие растения состоят из множества дифференцированных клеток, которые имеют различные функции, например, клетки зеленой ткани листа в результате фотосинтеза выделяют органические вещества, корневые клетки поглощают из почвы минеральные вещества и транспортируют их в другие части растения и т.д. Но все дифференцированные клетки образовались от зиготы (одной оплодотворенной яйцеклетки материнского растения). Зигота является генетической основой всего растения. Из данной клетки образуются специализированные ткани, отличающиеся по химизму происходящих в них процессов, форме и структуре.

При культивировании каллуса *in vitro* наблюдается неорганизованный рост клеток и их дедифференциация. Функции клеток практически одинаковы и они существуют за счет питательной среды. Следует отметить, что путём изменения условий культивирования можно вызвать вторичную дифференциацию и регенерировать целое растение. Это является большим преимуществом растительных клеток по сравнению с животными и человеческими клетками. Главную роль во вторичной дифференциации органов (корней и почек) из изолированных клеток и тканей играет соотношение фитогормонов (ауксинов и цитокининов) и их содержание в питательной среде [40].

Культивируемые клетки высших растений представляет собой уникальную клеточную популяцию, в которой каждая клетка является отдельным организмом, способным к автономному развитию. Способность

клеток к делению и росту может продолжаться очень долго при постоянном пассивировании [41].

1.4 Методы выделения алкалоидов

Большинство алкалоидов – твердые бесцветные кристаллические вещества, не имеющие запаха и горького вкуса. Алкалоиды в виде оснований являются жидкими веществами и обладают сильным неприятным запахом (физостигмин, никотин, колхицин). Алкалоиды-основания практически нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в различных органических растворителях: эфире, спирте, бензоле и др.

Соли алкалоидов, как правило, хорошо растворяются в воде и плохо растворяются в органических растворителях. Исключением является спирт, который хорошо растворяет большинство солей алкалоидов.

В большинстве случаев для извлечения алкалоидов пользуются методом экстракции соответствующими растворителями.

Существуют две группы методики выделения:

1) экстракция в виде солей

При экстракции в виде солей растительное сырье обрабатывается соответствующим растворителем, затем к нему прибавляется небольшое количество кислоты (винной, уксусной, соляной, лимонной и др.). Обработка ведется в перколяторах, в которые загружается измельчённое сырье и заливается растворитель. Раствор настаивается нескольких часов, затем осторожно выпускают через кран, расположенный в нижней части аппарата, а сырье снова заливают свежей порцией растворителя. Процесс продолжают таким образом до полного извлечения.

Соли алкалоидов обычно нерастворимы в эфире и углеводородах, а растворимы в воде и спирте (метиловом и этиловом). Поэтому при экстракции алкалоидов в виде солей в качестве экстрагента обычно используют воду или спирт. Несмотря на то, что экстракция алкалоидов в виде солей идет легко и

быстро, этот способ имеет такой недостаток, что спирт и вода извлекает из сырья наряду с алкалоидами большое количество «экстрактивных веществ» (белки, смолы, дубители, слизи и др.), присутствие которых часто сильно затрудняет обработку растворов.

2) экстракция в виде свободных оснований

При этом методе предварительной обработкой щелочью выделяют алкалоиды, находящиеся в растении в виде солей. В данном случае растение смачивают и тщательно растирают с раствором щелочи (аммиак, сода, едкий натр). Выбор подходящего растворителя в этом случае гораздо богаче ввиду того, что свободные алкалоиды растворимы не только в воде и спирте, но и в большом числе органических растворителей. В качестве растворителей чаще всего пользуются дихлорэтаном (а за границей и трихлорэтилен), бензолом, реже применяют эфир, хлороформ, четыреххлористый углерод, петролейный эфир и керосин. Каждый из этих растворителей имеет свои недостатки и свои преимущества.

Подбор соответствующей щелочи является основным моментом, так как, во-первых, многие алкалоиды очень чувствительны к действию сильных щелочей и могут при этом подвергаться нежелательным изменениям, а во-вторых, могут встретиться случаи, когда алкалоид представляет собой настолько сильное основание, что для его выделения из солей недостаточно слабых оснований вроде аммиака [42].

1.4.1 Методы разделения алкалоидной смеси и выделение индивидуальных веществ

В большинстве случаев при проведении экстракции, мы получаем сложную смесь оснований, и основной задачей является разделение ее на части и выделение индивидуальных веществ из смеси алкалоидов. Невозможно предугадать схему разделения смеси алкалоидов, и в каждом случае необходим

индивидуальный подход. Однако в течение долгого времени накопилась база на основе проведенных опытов.

1) Для разделения смеси алкалоидов применяется хроматография на основе различной адсорбционной способности.

Методика заключается в том, что через хроматографическую колонку, заполненную адсорбентом, пропускают исследуемый раствор, содержащий определенное количество алкалоидов. Далее раствор полностью проникает в слой адсорбента, колонка промывается органическим растворителем (хлороформ, петролейный эфир, спирт, бензол и др.), так же возможна обработка смесью различных растворителей. Далее при этом обычная обработка отдельно собранных фракций позволяет выделять индивидуальные соединения.

2) Разделение алкалоидов методом различных температур кипения.

Некоторые алкалоиды, находящиеся в смеси, отличаются друг от друга температурами кипения, это позволяет разделить их методом дробной перегонки. Так как алкалоиды, являются легко разлагающимися при высокой температуре и мало прочными веществами, данную разгонку обычно проводят при низком давлении. В большинстве случаев для полного очищения алкалоидов недостаточно одной дробной разгонки.

В последнее время для открытия и изучения алкалоидов используются хроматографические методы анализа, УФ-, ИК-, ЯМР-спектры [42].

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данной главе представлена информация об экспериментальных исследованиях: объект исследования, методы и методики проведения эксперимента.

Исследования по данной тематике требуют строгого соблюдения правил работы в микробиологической лаборатории. Для поддержания чистоты исследуемой культуры и проведения эксперимента лаборатория оснащена следующим оборудованием:

1. Суховоздушный шкаф-стерилизатор Binder;
2. Ламинарный шкаф SC2-4A1 Streamline Esco;
3. Цифровой автоклав (паровой стерилизатор) WiseCube;
4. Биореактор BIOSTAT Cplus, 20 л Sartorius;
5. Ферментер BIOSTAT Aplus, 5 л Sartorius;
6. Шкаф термостатируемый WiseCube;
7. Инкубатор WiseCube WIS-20 горизонтальный с орбитальным шейкером;
8. Бинокулярный микроскоп MC-100;
9. Весы лабораторные аналитические ACCULAB ALC 210;
10. pH-метр лабораторный типа pH-150 МИ;
11. Дистиллятор 3,5 л/ч;
12. Дозатор BIOHIT PROLINE 1-10 μ л, 10-100 μ л;
13. УФ/вид-спектрофотометр Cary 60, Agilent Technologies, 2000.

2.1 Объект исследования

Семена растения *Aconitum barbatum* были собраны в селе Коларово, расположенном на правом берегу реки Томи, в 15 км выше города Томска. Семена мелкие, серого, коричневого и черного цветов, имеют почти три грани и узкоплечатые ребра, сохраняют всхожесть в течение 1-1,5 лет.

Семена аконита можно посадить в открытый грунт осенью в октябре на слегка затененных участках. Всходы появятся весной следующего года. При весеннем посеве в открытый грунт семена аконита прорастают через год.

Для ускорения всхожести семян аконита можно провести стратификацию: сначала емкость с посаженными семенами аконита содержат в тепле при комнатной температуре (18-20°C) около месяца, затем в холоде при +2, +4°C (в холодильнике) до трех месяцев. После этого семена аконита помещают в тепло для прорастания. Периоды тепла и холода можно сократить по времени, но вместе с этим придется увеличить чередование температурных режимов (тепло-холод-тепло-холод-тепло) [43].

2.2 Приготовление питательной среды и вспомогательных растворов

Для приготовления питательных сред необходимо использовать реактивы высокой химической чистоты (ХЧ), так как их качество определяет результаты всего исследования. Для исследования использовали термостойкую посуду марки ХЧ. Перед тем как готовить питательную среду необходимо проавтоклавировать ее в течение 20 мин, при давлении 1 атм. и температуре 121°C.

Для получения каллусной культуры *Aconitum barbatum* использовали агазированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС). Состав питательной среды МС представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Состав модифицированной питательной среды МС:

| Компоненты | Содержание (мг/л) |
|---|-------------------|
| KNO ₃ | 1900 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 370 |
| CaCl ₂ * 2H ₂ O | 440 |
| Na ₂ *EDTA*2H ₂ O | 37,3 |
| FeSO ₄ *7H ₂ O | 27,8 |

| | |
|--|------------|
| KJ | 0,83 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 |
| MnSO ₄ *4H ₂ O | 22,3 |
| CuSO ₄ *5 H ₂ O | 0,025 |
| CoCl ₂ *6 H ₂ O | 0,025 |
| ZnSO ₄ *7H ₂ O | 8,6 |
| Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O | 0,25 |
| Тиамин - HCl | 1 |
| Пиридоксин -HCl | 0,5 |
| Никотиновая кислота | 0,5 |
| Сахароза | 60000 |
| Агар | 8000 |
| Дистиллированная H ₂ O | До 1 литра |
| pH | 5,8 |

2.2.1 Питательная среда Мурасиге и Скуга

Приготовление питательной среды МС состоит из нескольких, отдельно произведенных, стадий:

1. приготовление маточного раствора макросолей;
2. приготовление маточного раствора микросолей;
3. приготовление раствора Fe-хелат;
4. приготовление агазированной среды;
5. приготовление гормонов.

Приготовление маточного раствора макросолей

Для приготовления маточного раствора макросолей необходимо смешать в колбе на 1000 см³ 33,0 г нитрата аммония; 38,0 г нитрата калия; 8,8 г хлорида кальция; 7,4 г сульфата магния; 3,4 г калия дигидрофосфата и довести до метки бидистиллированной водой. Закрывают колбу ватно-марлевой пробкой или плотной фольгой. Данный раствор хранится в холодильнике не более 30 дней.

Приготовление маточного раствора микросолей

Для приготовления маточного раствора микросолей необходимо смешать в колбе на 1000 см³ 0,166 г иодида калия; 1,246 г борной кислоты;

4,460 г сульфата марганца; 1,720 г сульфата цинка; 0,050 г молибдата натрия; 0,005 г медного купороса; 0,005 г хлорида кобальта и довести до метки бидистиллированной водой. Закрывают ватно-марлевой пробкой или плотной фольгой. Данный раствор хранится в холодильнике не более 30 дней.

Приготовление раствора Fe-хелат

Для приготовления раствора Fe-хелата необходимо смешать в емкости из темного стекла на 1000 см³ 5,560 г железного купороса; 7,460 г натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты ("Трилон Б") и довести до метки бидистиллированной водой. Данный раствор хранится в холодильнике не более 30 дней.

2.2.2 Стерилизующий раствор

Стерилизующий раствор используют для стерилизации экспланта, чтобы избежать непродуктивных результатов. Стерилизующий раствор готовят путем смешивания 30 см³ 80% этанола с 6 см³ воды и 4 см³ 37% перекиси водорода.

2.2.3 Приготовление раствора гормонов

Для приготовления растворов ауксинов (2,4-Д, НУК) первоначально растворяют в этаноле, затем добавляют воду. Чтобы иметь концентрацию одного из таких фитогормонов из расчёта 1 мг/мл, растворяют 100 мг вещества в 1-2 см³ этилового спирта, добавляя 100 г воды и нагревая.

Цитокинины (6-БАП) предварительно растворяют в небольшом объеме 0,5 Н HCl и, подогревая на водяной бане, добавляют нужное количество воды.

2.3 Методика стратификации семян *Aconitum barbatum*

Стратификация семян - это создание для семян природных процессов пробуждения искусственно [44].

Стратификацию семян *Aconitum barbatum* проводили следующими способами:

- 1) Обработка семян *Aconitum barbatum* концентрированной серной кислотой (в течение 30 сек, затем помещают в губку с холодной водой, и ставят в холодильник).
- 2) Обработка семян аконита бородатого кипящей водой (в течение 2 мин и так же помещают в губку с холодной водой, и ставят в холодильник).
- 3) Механическая обработка семян аконита бородатого (обрабатывают семена механическим воздействием с помощью наждачной бумаги).
- 4) Смачивание водой при комнатной температуре (в течение 6 дней).
- 5) Смачивание водой в холоде (в течение 6 дней).

2.4 Методика получения каллусной культуры *Aconitum barbatum*

Подготовленную питательную среду разливают по баночкам 30 см³ по 10 см³. Семена обрабатывают стерилизующим раствором в ламинарном шкафу под ультрафиолетом в течение 15 мин. Далее оставляют под ламинарным потоком для полного удаления влаги. С помощью стерильного пинцета в асептических условиях, помещают семена на плотную питательную среду. Культивирование проводят при температуре 26°C.

2.5 Методика выделения суммы алкалоидов из растительного сырья и каллусных культур

12 г измельченной травы аконита бородатого, байкальского и Крылова переносят в колбу, добавляют 150 см³ 1%-го раствора соляной кислоты (HCl). Раствор процеживают через вату в мерный цилиндр и подщелачивают 10%-ным раствором аммиака до ясно щелочной реакции по фенолфталеину (измерение среды с помощью pH-метра). Точно отмеренный объем раствора (50 см³) переносится в делительную воронку объемом 250 см³. Далее проводят

трехкратную экстракцию хлороформом до полного извлечения алкалоидов. На границе слоев выпадает осадок в виде белых хлопьев. Хлороформный экстракт алкалоидов (нижнюю органическую фазу) пропускают через воронку Шотта, заполненную безводным сульфатом натрия, для удаления водной фазы. Сумму алкалоидов, из полученного экстракта, выделяют путем перегонки под вакуумом [45].

2.6 Методика разделения суммы алкалоидов на индивидуальные вещества

Разделение суммы алкалоидов проводили методом неклассической аффинной хроматографии с помощью жидкостной колоночной хроматографии (ЖКХ) [46].

Колоночную хроматографию проводили на азоепксиадсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ (сорбент предоставлен ЦНИЛ, КемГМУ МЗ России, г. Кемерово). Хроматографирование проводили в режиме гельпроникающей хроматографии на хроматографической колонке (0,5 х 80 «Pharmacia», Швеция), объем сорбента 5 см³. Объем пробы образца 0,2 см³. Скорость элюирования – 0,2 мл/мин, объем собираемых фракций – 0,2 см³. Элюент 0,01 М HCl. Детектирование проводили на длине волны 190 - 460 нм (спектрофотометр – 2000 А, Россия), после доведения объема фракций до 3 см³ водой дистиллированной. УФ-спектры полученных фракций сравнивали с УФ-спектрами стандартов.

2.7 Фиксация каллусной культуры

Под фиксацией материала понимают процесс быстрой гибели клеток в специально подобранных растворах ядовитых реактивов, которые называются фиксаторами. Фиксация прерывает тот или иной процесс в клетке, вызывая необратимые изменения.

Для фиксации каллусной ткани, использовался фиксатор Карнуа: 96%-ный этиловый спирт (3 части) и ледяная уксусная кислота (1 часть) [47].

Через каждые 4 дня отбирали каллус *Aconitum barbatum* из разных вариантов сред для фиксации и дальнейших исследований. Каллус доставали из контейнера с помощью пинцета, взвешивали и помещали в пенициллиновый флакончик с 2 см³ фиксатора Карнуа. Материал выдерживали в фиксаторе 12 часов в холодильнике. Затем фиксатор удаляли и дважды промывали 96%-этиловым спиртом до полного исчезновения запаха уксусной кислоты, после чего каллусную ткань заливали 70%-ным -этиловым спиртом и хранили при t=4°C.

2.8 Мацерация каллусной культуры

Первоначально было выбрано несколько вариантов мацерирующего раствора: 0.5н, 1н, 1.5н, 2н HCl в 1% уксусной кислоте; параллельно подбирали температурный режим в промежутке от 60 до 90°C с шаговым интервалом 10°C и время воздействия [48]. Мацерация каллусной ткани проводилась в 2 см³ мацерирующего раствора на водяной бане с временным интервалом 5-20 минут. После микроскопирования было обнаружено, что оптимальными условиями для мацерации явились: 1.5Н HCl, приготовленной на 1% CH₃COOH и температура 90°C со временем воздействия 10 мин. Остальные варианты были отвергнуты в связи с неудовлетворительными результатами, которые проявлялись в наличии не размацерированных агрегатов (низкие концентрации мацерирующего раствора, недостаточным временем воздействия и низкими температурами), либо разрушении клеток каллусной ткани (высокие концентрации мацерирующего вещества и длительного времени воздействия). Однако со временем наблюдалось разрушение клеток при хранении в мацерирующем веществе. Таким образом, было решено производить нейтрализацию мацерирующего раствора 2 каплями 20% NaOH. Готовые взвеси клеток хранились при 40°C.

2.9 Методики обработки полученных данных

2.9.1 Построение кривых роста

Для построения кривых роста каллусных культур в асептических условиях брали навеску каллусной ткани 40-60 мг (количество биологических повторностей составляло не менее 10) помещали на питательную среду МС с необходимыми вариантами гормонов. Закрывали контейнер фольгой, заматывали парафином и помещали в культуральную комнату в условия темноты при температуре ($t=25-27^{\circ}\text{C}$ и влажности 70%).

Показания снимались каждые 4 дней до конца пассажа. Брали следующие параметры для изучения и построения кривых: свежий первоначальный вес, свежий конечный вес, воздушно-сухой конечный вес. Воздушно-сухой первоначальный вес рассчитывали из пропорции:

$$W_{\text{сух.нач.}} = (W_{\text{свеж.нач.}} * W_{\text{сух.конеч.}}) / W_{\text{свеж.конеч.}}$$

Для определения свежего веса собирали с поверхности среды всю каллусную ткань при помощи пинцета с плоскими концами и взвешивают на весах, избегая подсыхания ткани на воздухе.

Для определения воздушно-сухой массы каллуса взвешивали сырой каллус (10 повторностей), а затем высушенный в термостате на чашках Петри. Каллус высушивали при $t = 55-60^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов и затем определяли его воздушно-сухую массу. Прирост воздушно - сухой массы выражали в процентах от сырой за вычетом воздушно-сухой массы исходного каллуса. Кривая отображает прирост каллусной ткани в мг по суткам [49].

2.9.2 Определение жизнеспособности культуры

Жизнеспособность определяли кондуктометрическим методом [50]. Для кондуктометрического анализа использовали программу Kodukt, поддерживаемую Microsoft Office Excel.

Для этого предварительно готовили 3% раствор сахарозы и измеряли его электропроводность.

Определение жизнеспособности в каллусной культуре. Брали 40 мг каллуса и помещали в плоскодонную колбу на 25 мл, заливали 3% сахарозой до 4 мл, затем диспергировали каллус. Ставили на 2 часа на шейкер при непрерывном взбалтывании (60 об./мин.). Встряхивание проводили для того чтобы происходил выход ионов из каллусной и суспензионной культур. После измеряли электропроводность раствора с клетками, затем помещали на водяную баню кипятили раствор в течении 30 мин., потом остужали и ставили на 2 часа снова на шейкер. После чего измеряли электропроводность с клетками после кипячения раствора.

После чего вычисляли жизнеспособность клеточной культуры по формуле:

$$Ж = 1 - \frac{(\varphi_{до.кип.} - \varphi_{3\%сахароза})}{(\varphi_{после.кип.} - \varphi_{3\%сахароза})} \cdot 100\% ,$$

где Ж - жизнеспособность, %;

$\varphi_{3\%сахароза}$ - электропроводность 3% сахарозы;

$\varphi_{до. кип.}$ - электропроводность раствора с клетками до кипячения;

$\varphi_{после. кип}$ - электропроводность раствора с клетками после кипячения.

2.9.3 Определение размеров растительных клеток

2.9.3.1 Измерение объема клеток под микроскопом

Размеры клеток определяли под микроскопом с помощью окулярной линейки или окулярного микрометра. Он представляет собой круглую стеклянную пластинку, на которой нанесена линейка со 100 делениями. Окуляр-микрометр вставляли в окуляр. На столик микроскопа помещали препарат и, глядя в окуляр, перемещали объект препаратомодителем, а линейку микрометра поворотом окуляра так, чтобы можно было измерить объект в делениях окуляр-микрометра.

Одновременно указывали марку микроскопа и увеличения объектива и окуляра. Измерив, необходимое число объектов (для каждой линии по 150 клеток), препарат снимали и на столик микроскопа помещали объект-микрометр ОМП, шкала которого имеет 100 делений. Общая длина ее 1мм; величина одного деления 10 мкм (0,01 мм). Шкалу объект-микрометра совмещали со шкалой окуляр-микрометра, используя ту же самую комбинацию окуляра и объектива, которую применяли для измерения объекта. Результаты измерений выражали в микрометрах. Цену одного деления окуляр-микрометра вычисляли по формуле:

$$(A*10)/B,$$

где А – число делений объект-микрометра; В – число делений окуляр-микрометра; 10 – величина одного деления объект-микрометра (мкм) [51].

2.9.3.2 Расчет объема клеток

Объем клеток (тыс. мкм³) вычисляется по формуле Ю.Л. Цельникер (1978) с учётом $K = L / D$, где L – длина клетки, D – ширина клетки.

При $L / D > 5$ объём клеток рассчитывается по формуле цилиндра:

$$V = \pi r^2 L k;$$

где: V – объём клетки, тыс. мкм³,

L – длина клетки, мкм,

r – 1/2 ширины клетки, мкм,

k – поправочный коэффициент (таблица 7).

Таблица 7 – Поправочные коэффициенты, для расчета объема клеток [52]

| L/D | K | L/D | K | L/D | K |
|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| 2,6 | 0,69 | 3,5 | 0,80 | 4,4 | 0,92 |
| 2,7 | 0,705 | 3,6 | 0,82 | 4,5 | 0,93 |
| 2,8 | 0,70 | 3,7 | 0,825 | 4,6 | 0,94 |
| 2,9 | 0,715 | 3,8 | 0,83 | 4,7 | 0,955 |
| 3,0 | 0,73 | 3,9 | 0,845 | 4,8 | 0,97 |

| | | | | | |
|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| 3,1 | 0,745 | 4,0 | 0,86 | 4,9 | 0,985 |
| 3,2 | 0,76 | 4,1 | 0,875 | 5,0 | 1,00 |
| 3,3 | 0,77 | 4,2 | 0,89 | | |
| 3,4 | 0,78 | 4,3 | 0,905 | | |

При $L / D < 2,5$ объём клеток рассчитывается по формуле эллипсоида вращения:

$$V = 3/4 \pi L / 2 (D / 2)^2,$$

где: V – объём клетки, мкм^3 ;

L – длина клетки, мкм ;

D – ширина клетки, мкм .

ГЛАВА 3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Получение растения технологией *in vitro*

Для получения каллусной культуры *Aconitum barbatum* в качестве экспланта были использованы семена. Так как семена являются наиболее удобными объектами в качестве экспланта. Их можно выращивать круглый год независимо от погодных условий и времени года.

В работе использовались контейнеры, пинцеты и стаканы, которые стерилизовались в сухожаровом шкафу. В подготовленные стерильные контейнеры (подписанные с обозначением вида исследуемых растений, номер пассажа, соотношение гормонов, даты посева и т.д.), разливают стерильную агаризованную безгормональную питательную среду МС. Пока застывала среда, семена готовят к посеву. Для этого их сначала помещают в 70% этиловый спирт (в течении 10 секунд), затем в 0,1% раствор сулемы (в течение 5 минут) и потом трехкратно ополаскивают стерильной дистиллированной водой. По завершению этих процедур семена равномерно помещают в подготовленные контейнеры на застывшую питательную среду МС. Закрывают контейнеры фольгой и парафином и помещают в культуральную комнату на БС (I=1000 лк, влажность – 70%). В этих условиях растения выращивались в течение 30 дней, однако признаков жизни у культуры не было обнаружено.



Рисунок 3 – Фотография семян *Aconitum barbatum*
на питательной среде (фото автора)

С целью повышения всхожести и ускорения прорастания семена подвергали стратификации. Способы обработки семян и их влияние на скорость каллусообразования представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Способы стратификации семян

| Способ обработки | Кипящая вода | Серная кислота, конц. | Механическая обработка | Смачивание водой |
|------------------|--------------|-----------------------|------------------------|------------------|
| Условия | 1 мин | 1 мин | 3-4 мин | 5-6 дней |

После предварительной обработки семена помещались на питательную среду МС, которая по литературным данным являлась наиболее подходящей для получения стерильного растения *Aconitum barbatum*.

Таблица 9 - Результаты наблюдения признаков всхожести

| Дни | Способ обработки | | | | |
|-----------|------------------------|----------------|------------------------|------------------|---------------------|
| | H ₂ O(кип.) | Серная кислота | Механическая обработка | Смачивание водой | Смачивание в холоде |
| 9 | - | - | - | + | - |
| 10 | - | - | + | + | - |
| 20 | - | - | + | + | - |
| 30 | + | - | + | + | + |
| 40 | + | + | + | + | + |
| 50 | + | + | + | + | + |
| 60 | + | + | + | + | + |

Первые признаки всхожести наблюдались у семян через 9,10 дней с начала эксперимента. Наиболее оптимальными способами стратификации являлись механическая обработка и смачивание водой. Однако у семян с механической обработкой через 35 начинается замедление роста.

Таким образом, оптимальным способом получения стерильного растения *Aconitum barbatum* из семян является смачивание водой в течение 5-6 дней. Фотография стерильного растения *Aconitum barbatum*, полученного технологией *in vitro* представлена на рис.4



Рисунок 4 – Фотография стерильного растения *Aconitum barbatum*

3.2 Индукция каллусообразования

Через 30 дней после посева семян стерильные растения аконита использовали для получения эксплантов (для индукции каллусообразования). В условиях асептики 30-дневные растения аконита извлекали пинцетом из контейнеров. С помощью пинцета и скальпеля рассекали листья, стебли и корни на небольшие сегменты площадью 2 x 2 (см²). Экспланты помещают в пробирки на питательные среды МС с гормональным составом НУК и БАП (таблица 10), так как данные гормоны способствуют как интенсивному росту культуры так и её синтезу вторичных метаболитов [53,54,55].

Таблица 10 – Варианты гормонального состава питательной среды МС для получения каллусной культуры *Aconitum barbatum*

| Гормоны | № варианта | | |
|---------|------------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 |
| НУК | 0,5 мг/л | 1 мг/л | 1,5 мг/л |
| БАП | 0,5 мг/л | 0,5 мг/л | 0,5 мг/л |

Образование каллусной ткани отмечали на 3-5 сутки культивирования (рисунок 5). Причем более интенсивное образование каллуса по сравнению с другими вариантами сред наблюдали на среде МС с гормональным составом НУК и БАП в концентрациях 1,5 мг/л и 0,5 мг/л соответственно. Однако при дальнейшем пассивировании динамика роста менялась и уже на втором пассаже активный каллусогенез наблюдался на среде с 0,5 НУК мг/л и 0,5 БАП мг/л.



Рисунок 5 – Образование каллуса из листового экспланта
Aconitum barbatum

Длительность субкультивирования (пассажа) составляла 28 дней. Интенсивность каллусогенеза оценивалась визуально по 5 балльной шкале, в течении четырех пассажей через каждые три дня. На протяжении культивирования через 4 дня снимались морфометрические показатели клеток, такие как длина, ширина, объем. Оценку роста каллусной культуры проводили по приросту воздушно-сухой биомассы.

В ходе культивирования на данных питательных средах отмечались различные морфогенные процессы (форма, структура). Цвет каллуса в зависимости от гормонального состава имел окраску от желтовато-беловато-матового до коричневого. Кроме этого, наблюдалось, что при увеличении НУК в питательной среде, каллус становится более плотным, приобретая компактную структуру, узловатые формы (таблица 11).

Таблица 11 – Морфогенные процессы в клеточных культурах *Aconitum barbatum* на разных вариантах сред

| Вариант | Морфологические признаки каллуса | | | | |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| | Пассаж | Окраска | Структура | Консистенция | Органогенез |
| 0,5 НУК мг/л 0,5 БАП мг/л | 1 | Светло-белесоватый | Крупенчатая, мелкозернистая | Плотный | Ризогенез |
| | 2 | Светло-желтая | Крупенчатая | Плотный, местами рыхловатый | Ризогенез |
| | 3 | Светло-желтая | Мелкозернистая | Рыхлый | |
| | 4 | Светло-желтая | Мелкозернистая | Рыхлый | |

Следует отметить, что в начале культивирования на всех вариантах сред наблюдалось каллусообразование и ризогенез. Причем ризогенез был более выражен на среде МС 1,5 НУК и 0,5 БАП, который длился до 4 пассажа. На среде же МС 0,5 НУК и 0,5 БАП и 1 НУК и 0,5 БАП ризогенез был замечен только до 2-3 субкультивирования, в дальнейшем ризогенез не наблюдался (таблица 11). Начиная с 3 пассажа каллусная культура аконита характеризовалась рыхлой консистенцией и желтоватой окраской. Прирост воздушно-сухой биомассы клеточной культуры на всех вариантах сред выражался типичной S-образной кривой (рисунок 6-7). Уровень статистически значимых различий между показателями прироста сухой массы каллуса на питательных средах с различным гормональным составом среде и показателями сухой массой не превышает 0,05.

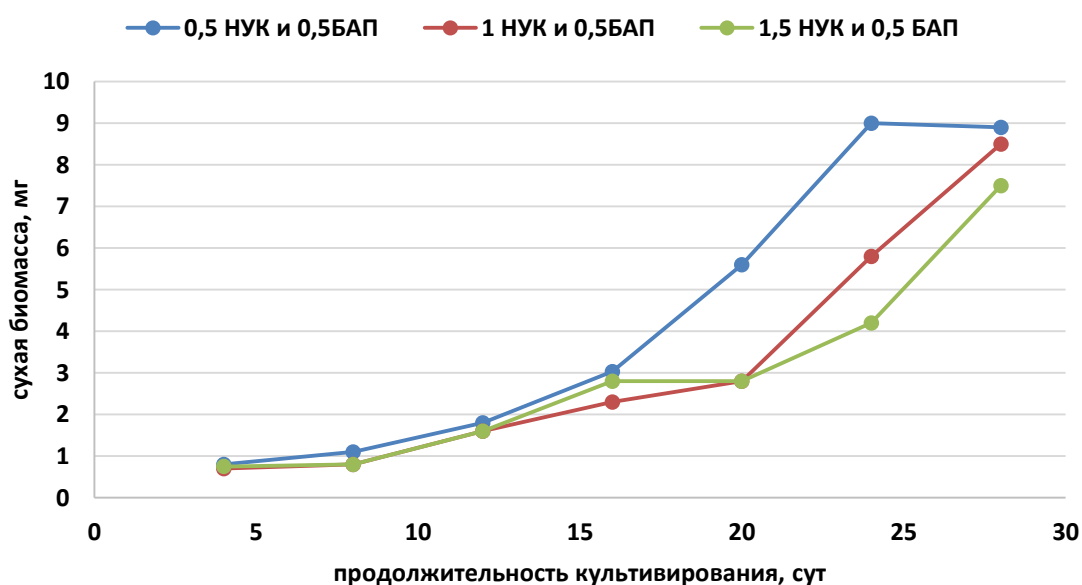


Рисунок 6 – Динамика роста каллусной культуры *Aconitum barbatum* на средах с разными концентрациями гормонов, 3-е субкультивирование

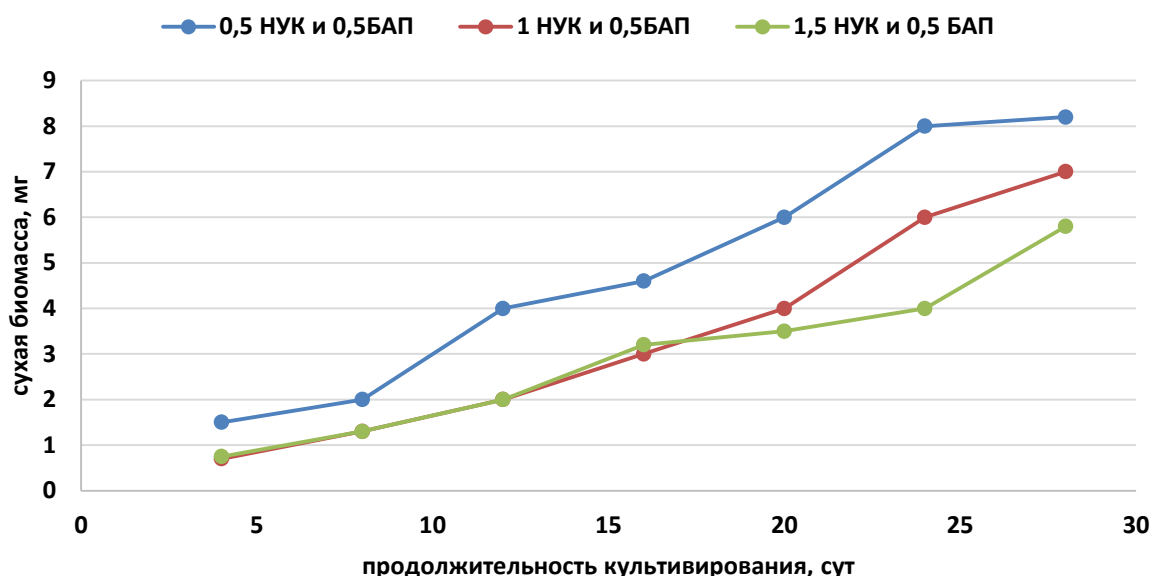


Рисунок 7 – Динамика роста каллусной культуры *Aconitum barbatum* на средах с разными концентрациями гормонов, 4-е субкультивирование

Как видно из полученных S-образных кривых, повышение концентрации экзогенного ауксина (НУК) приводит к понижению сухой биомассы, это связано с высокой обводненностью клеточной культуры на среде состава 1,5 НУК и 0,5 БАП. Максимальный прирост каллусной ткани наблюдается на среде МС 0,5 НУК и 0,5 БАП на 24 сутки.

3.3 Жизнеспособность каллусной культуры

Параллельно исследовалась жизнеспособность каллусной культуры аконита (согласно разделу 2.9.2) По полученным данным, жизнеспособность клеток во всех вариантах сред на протяжении всего периода культивирования в среднем составляла 53% (рисунок 8).

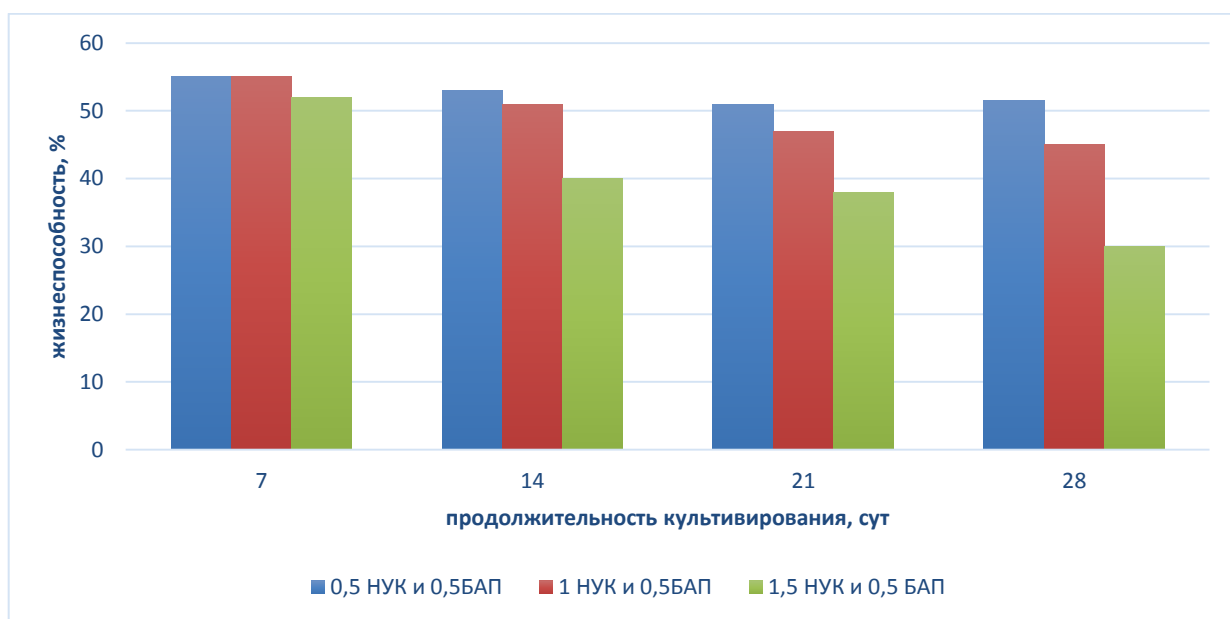


Рисунок 8 – Жизнеспособность клеточной культуры *Aconitum barbatum* на средах с разными концентрациями гормонов, 4-е субкультивирование

Согласно полученным данным, жизнеспособность каллусной культуры и прирост её биомассы на среде 1,5 НУК и 0,5 БАП был существенно ниже, чем на других вариантах сред.

Анализ морфометрических параметров каллусной культуры показал увеличение средних размеров клеток во всех вариантах сред в течение 0-4 пассажей. Отмечено, что в процессе субкультивирования объем клеток варьировал. Причем максимальное увеличения объема клеток происходило на 4, 8 и 28 сутки при культивировании каллуса на среде МС 0,5 НУК и 0,5 БАП, 1 НУК и 0,5 БАП, а на среде с гормональным составом 1,5 НУК и 0,5 БАП максимальное увеличения объема клеток происходило на 8, 16 и 28 сутки культивирования. Минимальный объем клеток для культуры, выращенной на среде МС 0,5 НУК и 0,5 БАП, 1 НУК и 0,5 БАП был установлен на 16 сутки культивирования, в то время как для культуры выращенной на среде МС 1,5 НУК и 0,5 БАП минимальный объем клеток установлен на 20-24 сутки (рисунок 9).

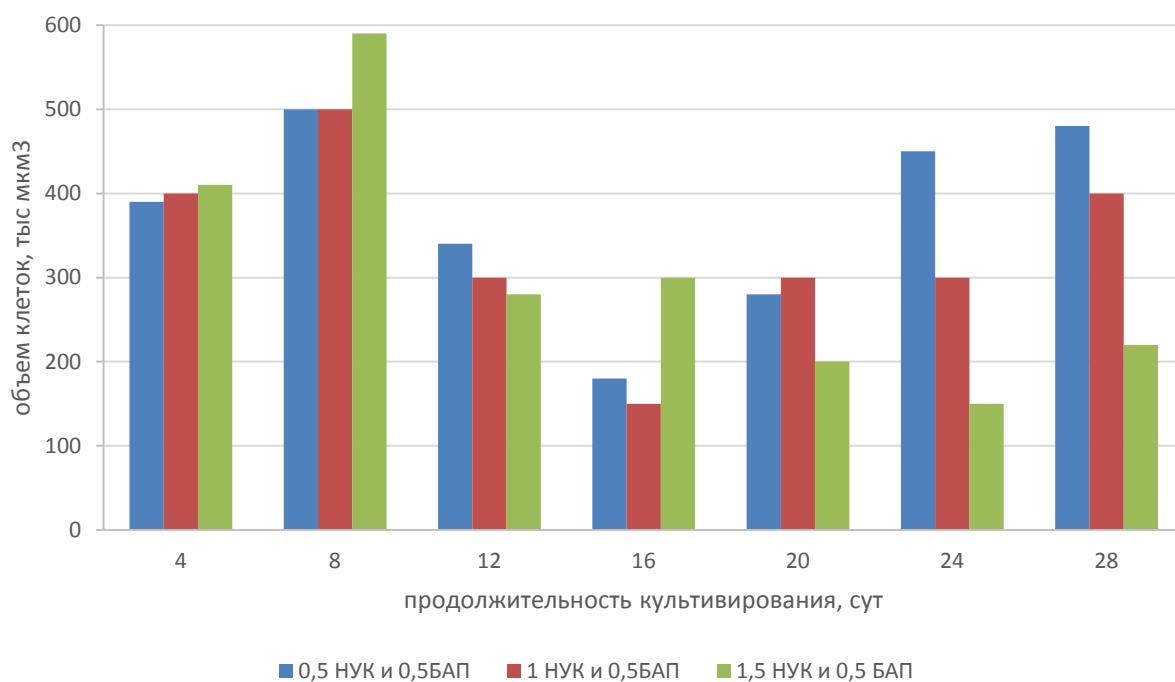


Рисунок 9 – Средний объем клеток каллусной культуры *Aconitum barbatum* на средах с разными концентрациями гормонов, 4-е субкультивирование

При проведении морфометрических исследований было отмечено преобладание мелких клеток и круглых на протяжении всего культивирования (таблица 12). Это может служить основанием для предположения, что каллусная культура на среде МС с НУК и БАП являются активно растущей.

Таблица 12 – Доля мелких, средних и крупных клеток (в %) в каллусных культурах *Aconitum barbatum*

| № пассажа | 0,5 НУК и 0,5 БАП | | | 1 НУК и 0,5 БАП | | | 1,5 НУК и 0,5 БАП | | |
|-----------|-------------------|---------|---------|-----------------|---------|---------|-------------------|---------|---------|
| | Мелкие | Средние | Крупные | Мелкие | Средние | Крупные | Мелкие | Средние | Крупные |
| 3 | 92 | 5 | 3 | 84 | 12 | 4 | 83 | 12 | 4 |
| 4 | 88 | 9 | 3 | 84 | 10 | 6 | 82 | 11 | 6 |

Разнообразие форм и размеров клеток связано, главным образом, с действием ауксинов и цитокинина. Результатом этого взаимодействия являются активация выделения ионов H^+ из клеток и подкисление пространства клеточных стенок. За счет этого подкисления создаются условия для их разрыхления: вытеснение Ca^{2+} из клеточных стенок, ослабление части водородных связей, снижение pH до 5,0 и ниже, благоприятного для деятельности в клетках кислых гидролаз [56]. Цитокинины в свою очередь инициируют процессы дифференцировки и деления клеток, усиливают синтетические процессы в них, стимулируют синтез ДНК, РНК и белка, развитие хлоропластов и других органелл [57]. Известно также, что цитокинины ингибируют процессы старения. В агрегатах где концентрация цитокининов высокая, происходит быстрее утилизация питательных веществ, благодаря чему клетки активно растут и дифференцируются.

В каллусной гетерогенной культуре были обнаружены помимо меристематических клеток округлой формы, клетки паренхиматозного типа разных размеров и формы – округлой, эллиптической и веретеновидной, которые были расположено беспорядочно (рисунок 10 - 12).

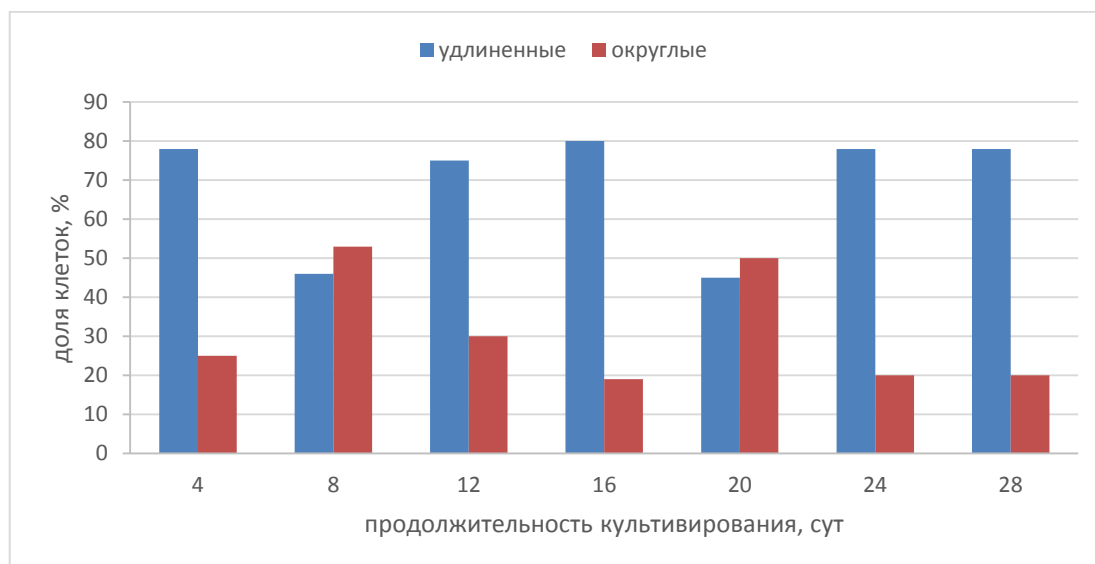


Рисунок 10 – Доля округлых и удлиненных клеток (в %) в каллусной культуре *Aconitum barbatum* на среде МС 0,5 НУК и 0,5 БАП, 4-е субкультивирование

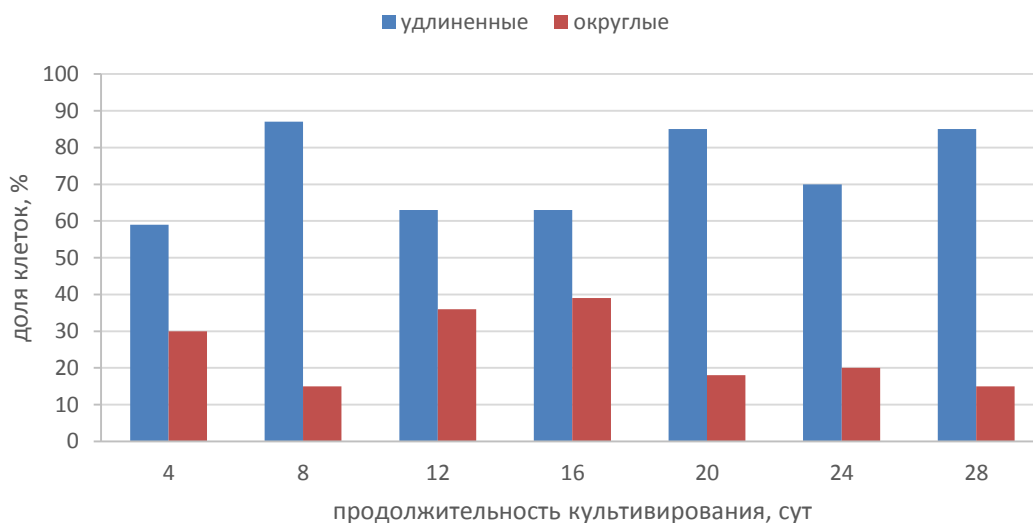


Рисунок 11 – Доля округлых и удлиненных клеток (в %) в каллусной культуре *Aconitum barbatum* на среде МС 1 НУК и 0,5 БАП, 4-е субкультивирование

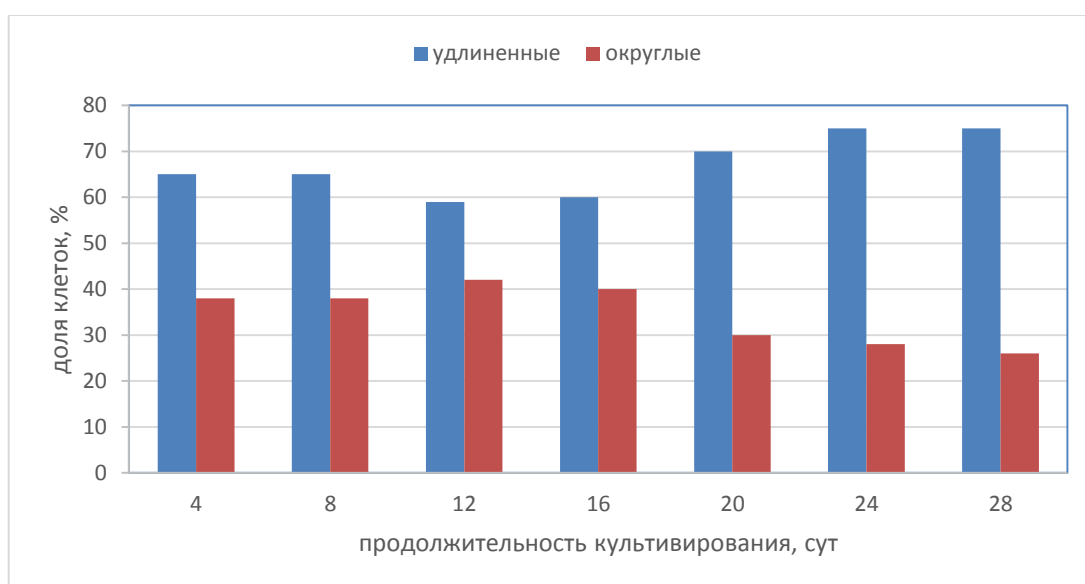


Рисунок 12 – Доля округлых и удлиненных клеток (в %) в каллусной культуре *Aconitum barbatum* на среде МС 1,5 НУК и 0,5 БАП, 4-е субкультивирование

Как видно из зависимостей, основная форма клеток в каллусной культуре *Aconitum barbatum* являются удлиненной. Причем в каллусной культуре, выращенной на среде МС 0,5 НУК и 0,5 БАП, на протяжении культивирования была корреляционная динамика изменения формы клеток.

Также наблюдалось формирование зачатков сосудистой ткани в каллусной культуре на первых этапах культивирования во всех вариантах сред и сохраняющиеся в последующем на протяжении всех пассажей в приблизительно равной доли 5-20%. При старении каллусной культуры, количество зачатков сосудистой ткани увеличивалось до 30%. Элементы клеточной дифференциации представлены в основном трахеидами, которые легко идентифицировались по спиралевидным утолщениям клеточной стенки (рисунок 13, таблица 12, приложение А).

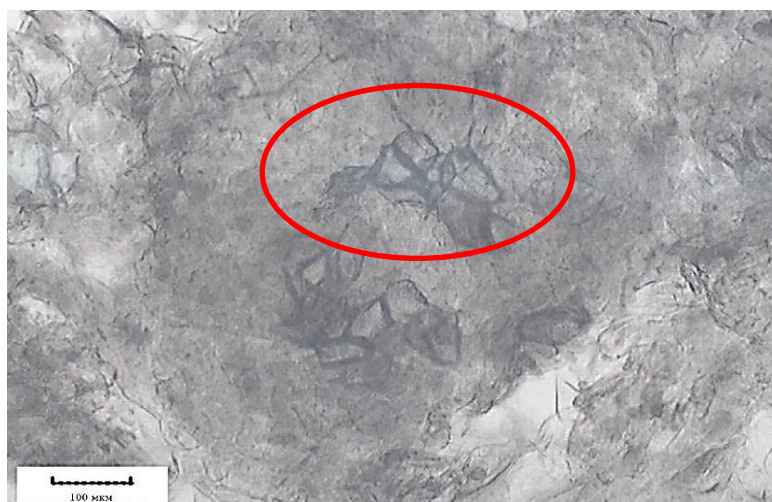
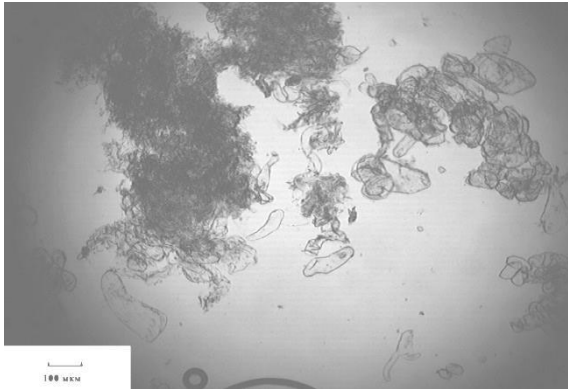



Рисунок 13 – Элементы сосудистой дифференциации в каллусной культуре

Таблица 12 - Элементы клеточной дифференциации при различных условиях выращивания

| | |
|---|--|
| <p>Клетки каллусной ткани растений <i>Aconitum barbatum</i> выращенного на среде МС с гормонами 0,5 НУК и 0,5 БАП, 4-й пассаж</p> |  |
|---|--|

| | |
|---|--|
| <p>Клетки каллусной ткани растений <i>Aconitum barbatum</i> выращенного на среде МС с гормонами 1 НУК и 0,5 БАП, 4-й пассаж</p> |  |
| <p>Клетки каллусной ткани растений <i>Aconitum barbatum</i> выращенного на среде МС с гормонами 1,5 НУК и 0,5 БАП, 4-й пассаж</p> |  |

3.4 Выделение суммы алкалоидов из растительного сырья и культуры ткани

Целью нашей работы являлось получение каллусной культуры для выделения алкалоидов. Поэтому следующим этапом нашей работы было выделение суммы алкалоидов из культуры ткани. Из литературных данных известно [19], что в аконите могут содержаться такие алкалоиды, как зонгорин, напеллин, лаппаконитин, N-окись 12-эпинапеллин и мезаконитин.

Для уточнения состава алкалоидов в культуре, использовали растительное сырье, который произрастал в селе Коларово, расположенном на правом берегу реки Томи. Далее по методике 2.4 производили выделение алкалоидов из культуры тканей и растительного сырья. В качестве сорбента для ЖКХ (согласно разделу 2.6) использовали азоэпоксиадсорбент Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ (предоставлено сотрудниками КемГУ кафедры фармацевтической химии). Сумму алкалоидов в сырье определяли с использованием УФ/вид-

спектрофотометра (Cary 60, Agilent Technologies, 2000) при длине волны 200-800 нм.

Уф-спектр исходных образцов (раствор смеси алкалоидов), которые свидетельствует о наличии алкалоидов представлен на рисунке 14 и 15.

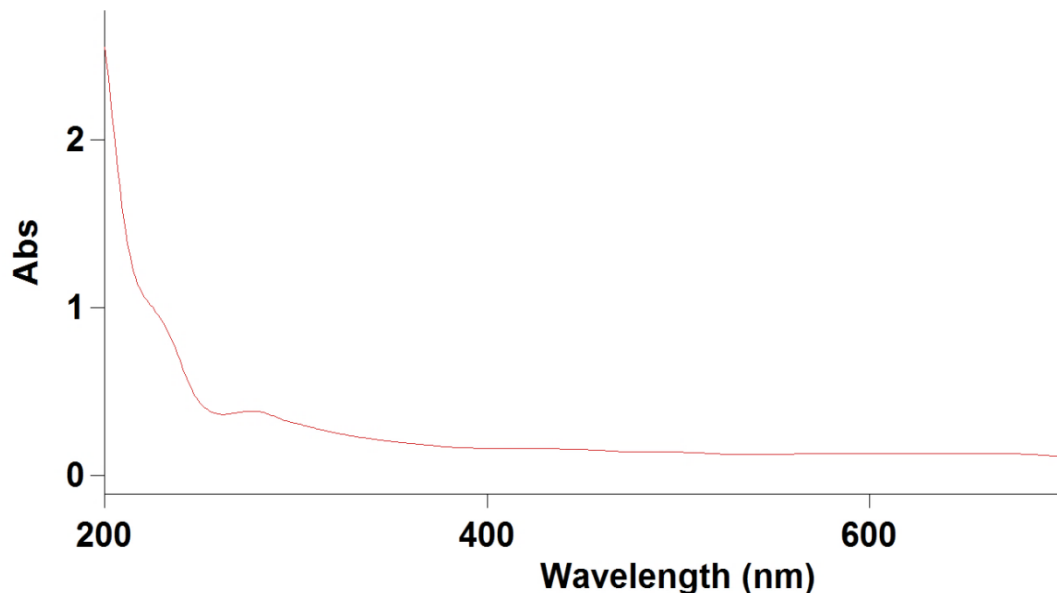


Рисунок 14 – Уф-спектр исходного образца (из растительного сырья)

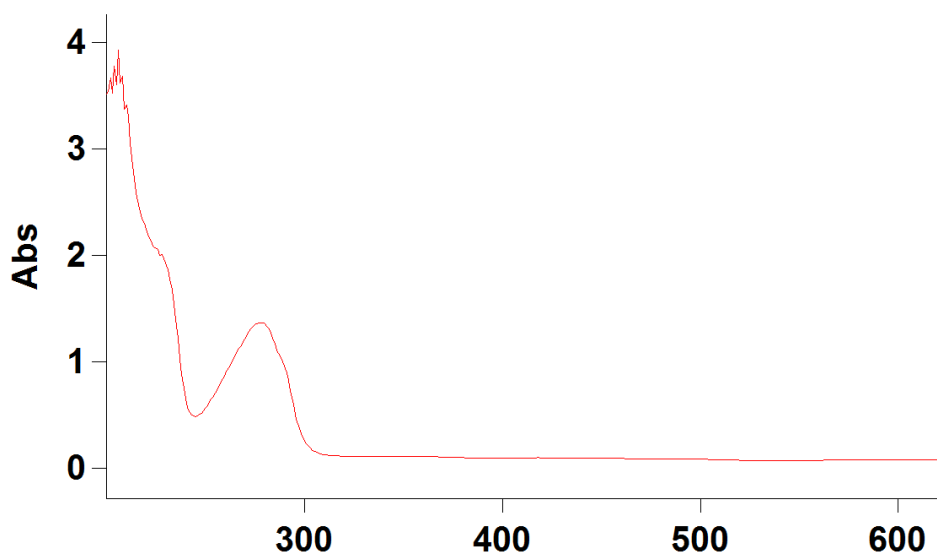


Рисунок 15 – Уф-спектр исходного образца (культура тканей)

Согласно полученным спектрофотометрическим данным был построен хроматографический профиль разделения суммы алкалоидов, который представлен на рисунке 16.

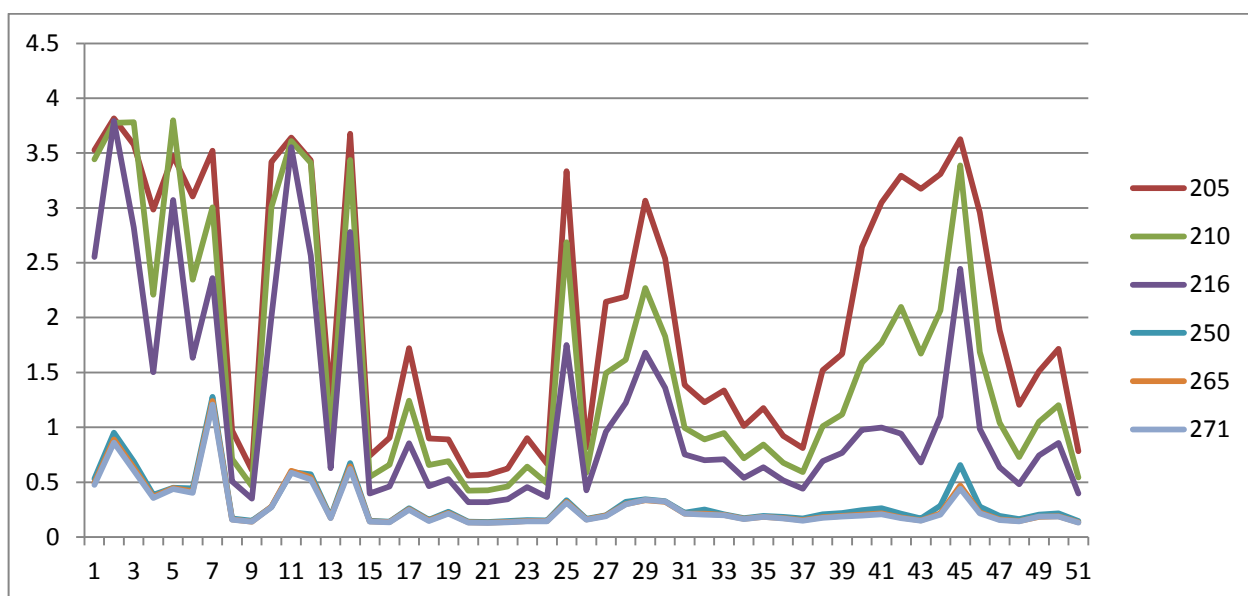


Рисунок 16 – Хроматографический профиль разделения суммы алкалоидов на азопоксиадсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ (из растительного сырья)

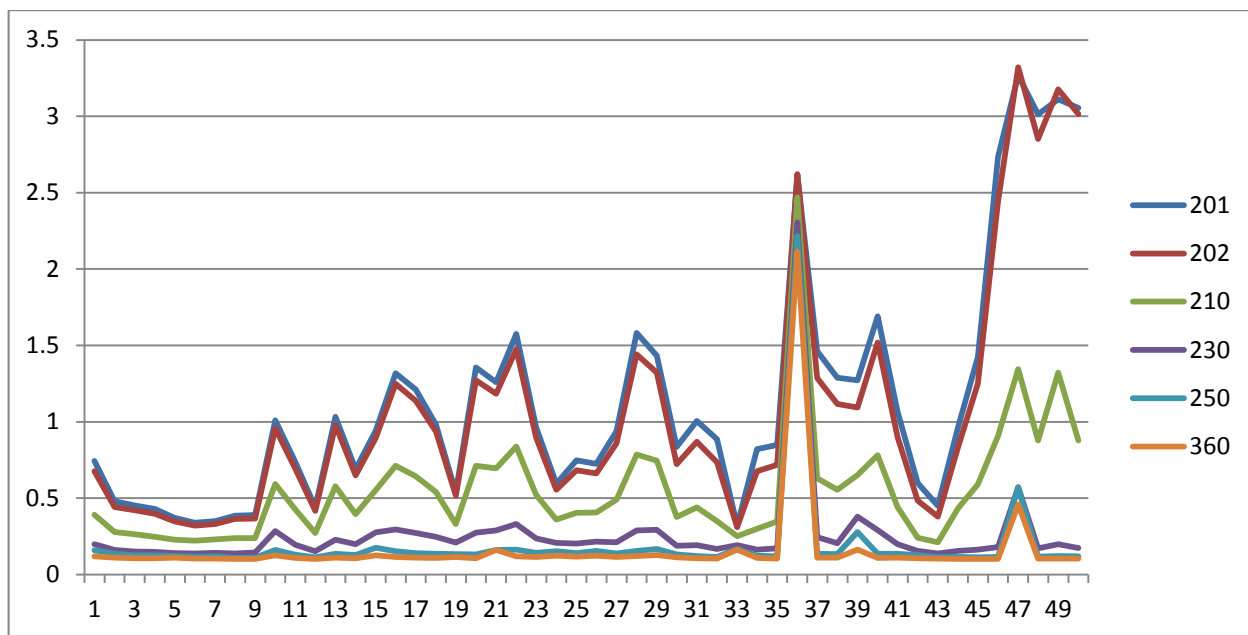


Рисунок 17 – Хроматографический профиль разделения суммы алкалоидов на азопоксиадсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ (культура тканей)

Наличие такого сложного профиля показывает, что в системе содержится несколько алкалоидов. Соответственно, нашей следующей задачей являлось качественное определение алкалоидов, входящих в систему.

Таким образом из хроматографического профиля (рисунок 16) были выделены следующие фракции для дальнейшего исследования: 11, 12, 14, 17-

23, 25 и 45. А из профиля фракций, полученных из культуры тканей (рисунок 17), были получены такие фракции, как: 11, 13, 16, 21, 22, 28, 31, 40 и 49.

Далее УФ-спектры фракций сравнивали с УФ-спектрами стандартных образцов алкалоидов (рисунок 18,19). УФ-спектры стандартных образцов алкалоидов представлены в Приложении Б.

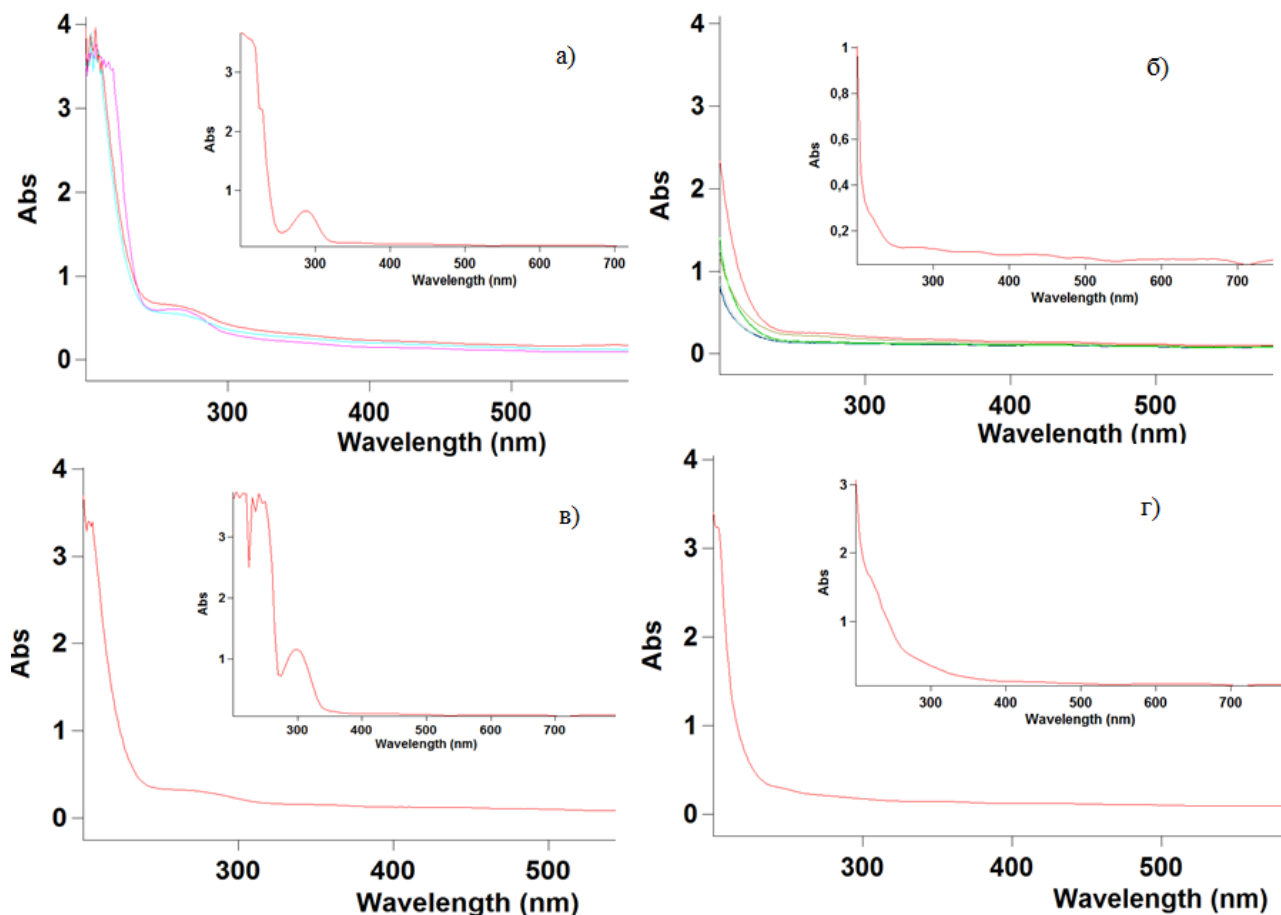


Рисунок 18 – УФ-спектры фракций (из растительного сырья) со стандартами:

а) 11, 12, 14 – зонгорин; б) 17-23 – напеллин;

в) 25 – лаппаконитин; г) 45 – мезаконитин

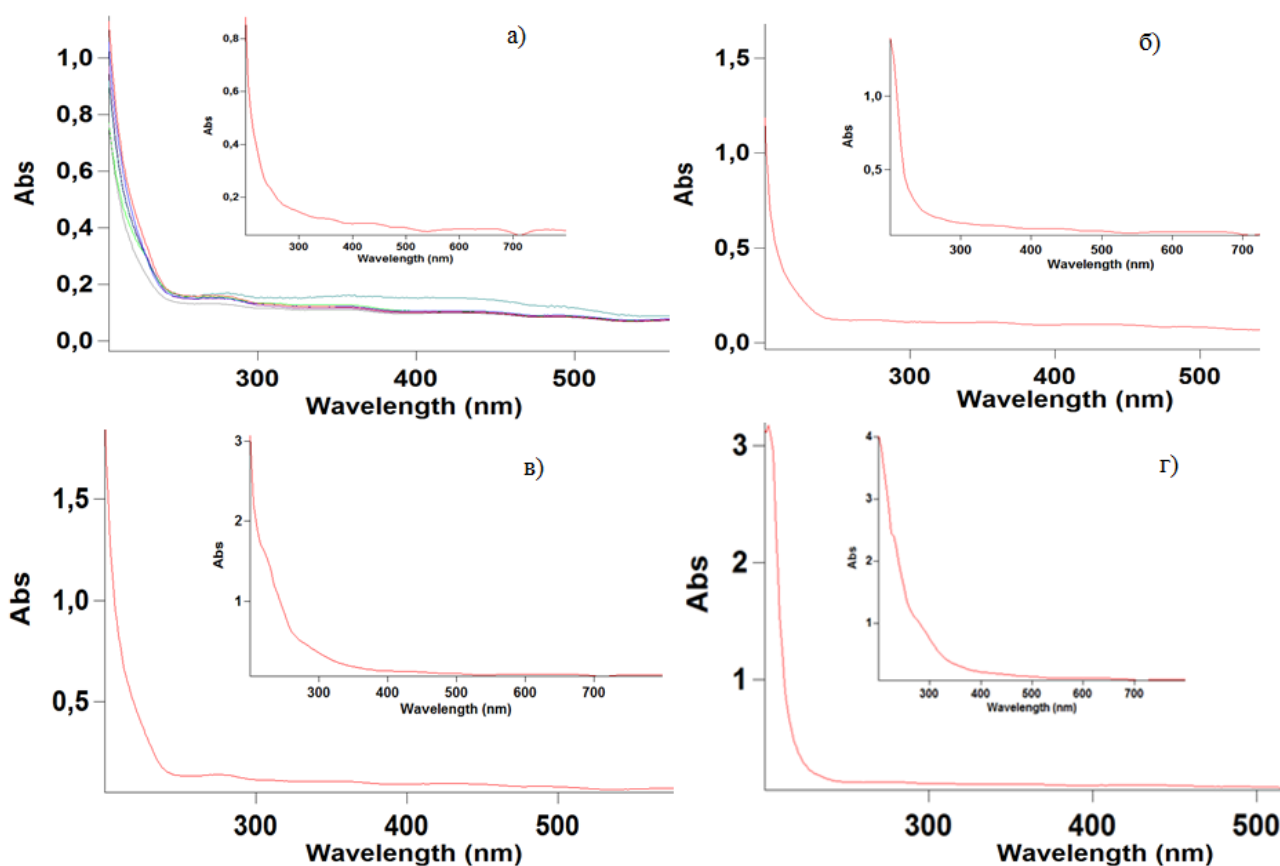


Рисунок 19 – УФ-спектры фракций (культура тканей) со стандартами:

а) 11, 13, 16, 21, 22, 28 – зонгорин; б) 31 – напеллин;

в) 40 – мезаконитин; г) 49 – N-окись 12-эпинапеллин

Из рисунков 18 и 19 видно, что УФ-спектры полученных фракций совпадали с УФ-спектрами стандартных образцов алкалоидов. А также состав алкалоидов в растительном сырье и культуре тканей отличаются. В алкалоидный состав растительного сырья входит такой алкалоид, как лаппаконитин, которого в культуре тканей отсутствует. Кроме того в культуре тканей зонгорин содержится в большем количестве, чем в растительном сырье, что видно из числа выраженных фракций, которые соответствуют стандарту данного алкалоида.

ГЛАВА 4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

4.1 Общая характеристика НИР

Научно-исследовательская работа связана с выделением суммы алкалоидов и индивидуальных веществ аконита бородатого. В настоящее время остро стоит проблема изыскания эффективных анальгезирующих и противовоспалительных лекарственных средств с минимальным числом нежелательных побочных эффектов. Применение синтетических препаратов в доклинических и клинических испытаниях сопровождаются выраженными осложнениями и побочными явлениями. В ограниченном диапазоне используют противовоспалительные свойства лекарственных препаратов получаемых из растений, преимущественно отличающиеся более легкой переносимостью и меньшей токсичностью. В связи с этим поиск эффективных антифлогистиков растительного происхождения является актуальным.

Объектом исследования в данной работе являются алкалоиды аконита бородатого.

Выбор объекта исследования не случаен, так как растения, содержащие в своем составе алкалоиды, считаются перспективными формами при создании лекарственных средств, для использования в медицинской практике. На сегодняшний день, несмотря на масштабность использования лекарственных препаратов из растений, многие представители отечественной флоры до сих пор не нашли применение в медицинской практике и являются лишь достоянием народной медицины.

В этом отношении представляет интерес изучение растений, содержащих алкалоиды, которые обладают разносторонней биологической активностью.

4.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

В настоящее время в клинической практике используются достаточно эффективные анальгетические и противовоспалительные препараты, однако большинство из них обладают рядом недостатков.

Рассмотрим следующие фармацевтические препараты. Препараты «Анальгин» и «Индометацин» прошли доклинические и клинические испытания и разрешены Минздравом для медицинского применения и промышленного выпуска.

Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения проведем с помощью оценочной карты таблица 13.

Таблица 13 – Оценочная карта сравнения конкурентных разработок

| Критерии оценки | Вес критерия | Баллы | | | Конкурентно-способность | | |
|---|--------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| | | Б _ф | Б _{к1} | Б _{к2} | К _ф | К _{к1} | К _{к2} |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Технические критерии оценки ресурсоэффективности | | | | | | | |
| 1. Технологическая сложность выделения | 0.1 | 4 | 5 | 5 | 0.4 | 0.5 | 0.5 |
| 2. Побочные эффекты | 0.2 | 5 | 1 | 1 | 1 | 0.2 | 0.2 |
| 3. Уменьшение болевого эффекта | 0.1 | 5 | 4 | 4 | 0.5 | 0.4 | 0.4 |
| 4. Токсичность в организме | 0.1 | 4 | 4 | 5 | 0.4 | 0.4 | 0.5 |
| Экономические критерии оценки эффективности | | | | | | | |
| 1. Стоимость сырья | 0.2 | 4 | 3 | 3 | 0.8 | 0.6 | 0.6 |
| 2. Стоимость курса лечения | 0.1 | 4 | 4 | 5 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 3. Стоимость препарата | 0.2 | 5 | 4 | 4 | 1 | 0.8 | 0.8 |
| Итого | 1 | 35 | 29 | 27 | 4.4 | 3.3 | 3.5 |

Анализ был проведен сравнительно с двумя основными препаратами: конкурент 1 – «Анальгин», конкурент 2 – «Индометацин». В результате научная разработка по сравнению с зарубежным поставщиком является конкурентноспособной.

4.3 SWOT-анализ

SWOT – (Strengths – сильные стороны, Weaknesses – слабые стороны, Opportunities – возможности и Threats – угрозы) – это комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Первый этап SWOT-анализа

| | | |
|--|--|---|
| | Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Экологичность производственной технологии С2. Минимальное количество противопоказаний и побочных эффектов С3. Квалифицированный персонал С4. Не используются синтетические составляющие в составе ЛВ С5. Комплексный болеутоляющий эффект | Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Стоимость и отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца Сл2. Отсутствие достаточного финансирования проектов Сл3. Недостаток литературных данных по данному проекту Сл4. Ограниченность ресурса, в связи с сезонным произрастанием трав рода аконитов. Сл5. Ценовые затраты на курс лечения |
| Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Появление спроса на продукт В3. Замена синтетических препаратов на ЛВ с растительными компонентами | | |
| Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства У2. Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции У3. Ограничения на | | |

| | | |
|--|--|--|
| экспорт технологии У4. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства | | |
|--|--|--|

Второй этап состоит в выявлении соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды. Это соответствие или несоответствие должны помочь выявить степень необходимости проведения стратегических изменений.

В рамках данного этапа необходимо построить интерактивную матрицу проекта. Ее использование помогает разобраться с различными комбинациями взаимосвязей областей матрицы SWOT. Каждый фактор помечается либо знаком «+» (означает сильное соответствие сильных сторон возможностям), либо знаком «-» (что означает слабое соответствие); «0» – если есть сомнения в том, что поставить «+» или «-».

Интерактивные матрицы представлены в таблицах 15,16,17 и 18.

Таблица 15 – Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и возможности»

| Сильные стороны проекта | | | | | | |
|-------------------------|----|----|----|----|----|----|
| Возможности проекта | | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
| | B1 | + | + | - | 0 | + |
| | B2 | - | + | + | - | 0 |
| | B3 | - | + | + | - | 0 |

Таблица 16 – Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и возможности»

| Слабые стороны проекта | | | | | | |
|------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Возможности проекта | | Сл1 | Сл2 | Сл3 | Сл4 | Сл5 |
| | B1 | - | + | + | + | - |
| | B2 | + | + | 0 | - | - |
| | B3 | + | + | - | + | - |

Таблица 17 – Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и угрозы»

| Сильные стороны проекта | | | | | | |
|-------------------------|----|----|----|----|----|----|
| Угрозы | | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
| | У1 | - | - | - | 0 | + |
| | У2 | - | + | + | + | - |
| | У3 | + | + | 0 | + | - |
| | У4 | + | - | + | - | + |

Таблица 18 – Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и угрозы»

| Слабые стороны проекта | | | | | | |
|------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Угрозы | | Сл1 | Сл2 | Сл3 | Сл4 | Сл5 |
| | У1 | + | + | + | 0 | + |
| | У2 | - | + | - | - | 0 |
| | У3 | + | + | - | + | 0 |
| | У4 | + | + | - | 0 | + |

Таким образом, в рамках третьего этапа может быть составлена итоговая матрица SWOT-анализа, представленная в таблице 19.

Таблица 19 – Итоговая матрица SWOT-анализа

| | | |
|--|--|---|
| | Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Экологичность производственной технологии С2. Минимальное количество противопоказаний и побочных эффектов С3. Квалифицированный персонал С4. Не используется синтетические составляющие в составе ЛВ С5. Комплексный болеутоляющий эффект | Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Стоимость и отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца Сл2. Отсутствие достаточного финансирования проектов Сл3. Недостаток литературных данных по данному проекту Сл4. Ограниченность ресурса, в связи с сезонным произрастанием трав рода аконитов. Сл5. Ценовые затраты на курс лечения |
| Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Появление спроса на продукт В3. Замена синтетических препаратов на ЛВ с растительными компонентами | С1. Разработка нового метода выделения зонгорина на модифицированном азоэпоксиадсорбенте С2. Появится большой спрос на ЛВ за счет быстрого синтеза продукта. | Сл1. Отсутствие некоторых необходимых оборудования для проведения опытов Сл2. Не до конца изучен данный метод синтеза |
| Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства У2. Введения дополнительных государственных требований к | С1. Синтез данным методом ускорит получение продукта, тем самым увеличив спрос на внутреннем рынке С2. Снижение зависимости от внешних рынков С3. Прибыль на внутреннем рынке | Сл1. Отсутствие рекламной компании на данный продукт Сл2. Отсутствие единого документа, подтверждающего качество ЛС Сл3. Недостаточная прибыль |

| | | |
|--|--|--|
| сертификации продукции У3. Ограничения на экспорт технологии У4. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства | С4. Повышение себестоимости С5. Рынок имеет более дешевые синтетические препараты. С6. Изменение платежеспособности населения. | |
|--|--|--|

Лабораторные исследования проходят достаточно в стабильных условиях, однако для получения дополнительных конкурентных преимуществ перед синтетическими лекарственными препаратами необходимо получить поддержку Министерства Здравоохранения России, тем самым занять свою нишу на рынке производства и сбыта.

4.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации

Таблица 20 – Оценка готовности проекта к коммерциализации

| № п/п | Наименование | Степень проработанности научного проекта | Уровень имеющихся знаний у разработчика |
|-------|--|--|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1. | Определен имеющийся научно-технический задел | 4 | 4 |
| 2. | Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела | 4 | 4 |
| 3. | Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке | 5 | 5 |
| 4. | Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок | 5 | 5 |
| 5. | Определены авторы и осуществлена охрана их прав | 5 | 4 |
| 6. | Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности | 4 | 4 |
| 7. | Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта | 4 | 3 |
| 8. | Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки | 4 | 3 |
| 9. | Определены пути продвижения научной разработки на рынок | 5 | 5 |
| 10. | Стратегия реализации научной разработки | 5 | 5 |

| | | | |
|-----|---|----|----|
| 11. | Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок | 2 | 2 |
| 12. | Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот | 3 | 3 |
| 13. | Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки | 5 | 5 |
| 14. | Имеется команда для коммерциализации научной разработки | 5 | 5 |
| 15. | Проработан механизм реализации научного проекта | 5 | 5 |
| | Итого баллов: | 73 | 62 |

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (или уровень имеющихся знаний у разработчика) определяется по формуле:

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i, (2)$$

где $B_{\text{сум}}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению;

B_i – балл по i -му показателю.

Значение $B_{\text{сум}}$ позволяет говорить о мере готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации. Так, если значение $B_{\text{сум}}$ получилось от 75 до 60, то такая разработка считается перспективной, а знания разработчика достаточными для успешной ее коммерциализации. Данная разработка является перспективной.

4.5 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

Передача интеллектуальной собственности в уставной капитал предприятия.

НИИ Фармакологии является научно исследовательской лабораторией, внедрение и отработка технологий. Далее само предприятие решает вопросы продажи полученного продукта.

4.6 Инициация проекта

Цели и результат проекта.

Таблица 21 – Заинтересованные стороны проекта

| Заинтересованные стороны проекта | Ожидания заинтересованных сторон |
|---|--|
| Национальный Исследовательский Томский Политехнический Университет, кафедра ФАХ | Технология получения алкалоидов |
| НИИ фармакологии ГУ ТНЦ СО РАМН | Результаты исследования биологической активности |

Таблица 22 – Цели и результаты проекта

| | |
|--------------------------------------|---|
| Цели проекта: | Получить каллусную культуру <i>Aconitum barbatum</i> , продуцентов фармакологически ценных алкалоидов |
| Ожидаемые результаты проекта: | Получить образцы алкалоидов, данные по биологической активности |
| Критерии приемки результата проекта: | Физико-химические характеристики алкалоидов, количественные данные по анальгетическому действию |
| Требования к результату проекта: | Требование: |
| | Обоснованность выбора темы исследования |
| | Новизна полученных результатов |
| | Рекомендации к использованию результатов исследования |

4.7 Организационная структура проекта

На данном этапе работы необходимо описать: кто входит в рабочую группу данного проекта, определить роль каждого участника в данном проекте, а также прописать функции, выполняемые каждым из участников и их трудозатраты в проекте. Эту информацию представить в табличной форме (таблица 23).

Таблица 23 – Рабочая группа проекта

| № п/п | ФИО | Роль в проекте | Функции | Трудозатраты, час. |
|-------|--------------|----------------|---|--------------------|
| 11 | Чернова А.П. | Руководитель | Выбор направления исследований, формулировка темы, консультации и обсуждение полученных результатов | 128 |
| 22 | Зоригт Д. | Дипломник | Разработка плана работ, выполнение | 640 |

| | | | | |
|--------|----------------|---------|--|------|
| | | | работ, обсуждение полученных результатов | |
| 33 | Дорофеева Н.В. | Инженер | Выделение алкалоидов методами ИК - спектроскопией и газовой хроматографией | 640 |
| Итого: | | | | 1408 |

Трудозатраты были рассчитаны на основании следующих данных: проект выполняется 4 месяца, руководитель проекта принимает участие 4 раза в неделю на протяжении 2-х часов, инженер дипломник работает в среднем 5 дней в неделю по 8 часов.

Ограничения и допущения проекта

Таблица 24 – Ограничения проекта

| Фактор | Ограничения/ допущения |
|---|--|
| 3.1. Источник финансирования | НИ ТПУ |
| 3.2. Сроки проекта: | С 1.02.2017 по 20.06.2017 |
| 3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом | 1.02.2017 |
| 3.2.2. Дата завершения проекта | 1.06.2017 – 10.06.2017 |
| 3.3. Прочие ограничения и допущения* | Время использования научного оборудования. |

4.8 Планирование управления научно-техническим проектом

Научно-исследовательскую работу можно разделить на отдельные части (этапы), содержание которых определяется спецификой темы. Как правило, НИР включает в себя следующие этапы:

Подготовительный этап. К этому этапу относится сбор и изучение литературных данных, составление литературного обзора по выбранной тематике, подготовка рабочего места, подготовка исходных веществ, химических реактивов и вспомогательных веществ.

Экспериментальная часть. Этот этап включает непосредственное проведение цикла экспериментов и обработку полученных результатов. Обсуждение результатов, вывод о проделанной работе.

Заключительный этап. Выполнение графической части, оформление пояснительной записки.

4.8.1 Контрольные события проекта

В рамках данного раздела необходимо определить ключевые события проекта, определить их даты и результаты, которые должны быть получены по состоянию на эти даты (таблица 25).

Таблица 25 – Контрольные события проекта

| Контрольное событие | Дата | Результат (подтверждающий документ) |
|---|----------|--|
| Литературный обзор проблематики | 01.02.17 | Литературный обзор в ВКР |
| Постановка цели и задач | 15.02.17 | Раздел цели и задачи в ВКР |
| Разработка плана экспериментальных работ | 17.02.17 | План работ |
| Приготовление питательной среды для получения каллусной культуры | 18.02.17 | Результаты экспериментов, представленных в ВКР |
| Посадка семян аконита бородатого на питательную среду | 26.02.17 | Результаты экспериментов, представленных в ВКР |
| Подбор рабочих условий для получения каллусных культур аконита бородатого методом <i>in vitro</i> | 07.03.17 | Результаты экспериментов, представленных в ВКР |
| Посадка стратифицированных семян аконита бородатого на питательную среду | 01.04.17 | Результаты экспериментов, представленных в ВКР |
| Выращивание каллусной культуры | 21.04.17 | Результаты экспериментов, представленных в ВКР |
| Выделение алкалоидов из каллуса | 01.05.17 | Результаты экспериментов, представленных в ВКР |
| Оформление ВКР | 01.06.17 | Окончательный вариант ВКР |

4.8.2 План проекта

В рамках планирования научного проекта необходимо построить календарный график проекта (таблица 26).

Таблица 26 – Календарный план проекта

| Название | Длительность, дни | Дата начала работ | Дата окончания работ | Состав участников (ФИО ответственных исполнителей) |
|---|-------------------|-------------------|----------------------|--|
| Выбор направления исследования | 5 | 20.01.17 | 25.01.17 | Чернова А.П. Зоригт Д. |
| Составление технического задания | 7 | 25.01.17 | 31.01.17 | Чернова А.П. |
| Изучение литературы | 15 | 01.02.17 | 15.02.17 | Зоригт Д. |
| Подбор оптимальных методик и их совершенствование | 7 | 10.02.17 | 17.02.17 | Чернова А.П. Зоригт Д. |
| Подготовка исходных материалов | 5 | 12.02.17 | 17.02.17 | Зоригт Д. |
| Приготовление питательной среды для получения каллусной культуры аконита бородатого. Посадка семян аконита бородатого на питательную среду. Подбор рабочих условий для получения каллусных культур аконита бородатого методом <i>in vitro</i> . | 30 | 18.02.17 | 01.04.17 | Чернова А.П. Зоригт Д. |
| Посадка стратифицированных семян аконита бородатого на питательную среду | 15 | 01.04.17 | 21.04.17 | Чернова А.П. Зоригт Д. |
| Наблюдение за ростом каллусной культуры. | 8 | 21.04.17 | 01.05.17 | Чернова А.П. Зоригт Д. |
| Выделение алкалоидов из каллуса | 15 | 01.05.17 | 23.05.17 | Чернова А.П. Дорофеева Н.В. Зоригт Д. |
| Обработка и обсуждение результатов | 8 | 23.05.15 | 30.05.15 | Чернова А.П. Зоригт Д. |
| Оформление ВКР | 7 | 01.06.15 | 10.06.15 | Зоригт Д. |
| Итого: | 122 | | | |

Диаграмма Ганта – это тип столбчатых диаграмм(гистограмм), использующийся для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками,

характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. Календарный рейтинг-план представлен в приложении В.

4.9 Бюджет научного исследования

4.9.1 Расчет материальных затрат НТИ

Бюджет затрат на выполнение НТИ составляется с целью проведения данной работы. Затраты на НТИ рассчитываются по статьям калькуляции, которые включают две группы затрат прямые затраты и накладные затраты.

Расчет стоимости материальных затрат производился по действующим прейскурантам и ценам с учетом НДС. В стоимость материальных затрат включили транспортно-заготовительные расходы (3 – 5 % от цены).

Результаты расчета затрат на сырье, материалы и покупные изделия в процессе проведения НИР представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Материальные затраты

| Наименование | Ед. изм. | Количество | | | Цена за ед., руб. | | | Затраты на материалы, (З _м), руб. | | |
|-----------------------------------|-------------|------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|--|-------|-------|
| | | Исп.1 | Исп.2 | Исп.3 | Исп.1 | Исп.2 | Исп.3 | Исп.1 | Исп.2 | Исп.3 |
| Нитрат аммония | кг | 1 | 1 | 1 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| Нитрат калия | кг | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 200 | 200 | 200 | 40 | 40 | 40 |
| Кальций хлористый 2-водный | кг | 1 | 1 | 1 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 |
| Магний сернокислый 7-водный | кг | 1 | 1 | 1 | 158 | 158 | 158 | 158 | 158 | 158 |
| Калий фосфорнокислый 1-замещенный | кг | 1 | 1 | 1 | 458 | 458 | 458 | 458 | 458 | 458 |
| Иодид калия | кг | 1 | 1 | 1 | 734 | 734 | 734 | 734 | 734 | 734 |
| Борная кислота | кг | 1 | 1 | 1 | 119 | 119 | 119 | 119 | 119 | 119 |
| Серная кислота | кг | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 95 | 95 | 95 | 171 | 171 | 171 |
| Хлорид натрия | кг | 1 | 1 | 1 | 58 | 58 | 58 | 58 | 58 | 58 |
| Хлороформ | кг | 8 | 8 | 8 | 247 | 247 | 247 | 1976 | 1976 | 1976 |
| Гидроксид аммония | л | 1 | 1 | 1 | 54 | 54 | 54 | 54 | 54 | 54 |
| Никотиновая | л | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 13300 | 13300 | 13300 | 133 | 133 | 133 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|----|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|-------------|
| кислота | | | | | | | | | | |
| Пиридоксин-НСl | л | 0,01 | 0,1 | 0 | 270 | 270 | 270 | 27 | 27 | 27 |
| Тиамин -НСl | л | 0,01 | 0 | 0,1 | 2800 | 2800 | 2800 | 28 | 0 | 280 |
| Глицин | кг | 0,11 | 0,05 | 0,15 | 273 | 273 | 273 | 30 | 13,7 | 409,5 |
| Сахароза | кг | 1 | 0,3 | 0,5 | 451 | 451 | 451 | 451 | 135,3 | 225,5 |
| Агар-агар | кг | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 3650 | 3650 | 3650 | 365 | 365 | 365 |
| Итого: | | | | | | | | 4871 | 4511 | 5277 |

4.9.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по данной теме. Все расчеты по приобретению спецоборудования и оборудования, используемого для каждого исполнения темы, сводятся в таблице 28.

Таблица 28 – Затраты на оборудование для научно-экспериментальных работ

| № п/п | Наименование оборудования | Кол-во единиц оборудова ния | Цена единицы оборудования, руб. | Сумма амортизационных отчислений, руб. |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1. | Делительная воронка | 1 | 856 | 57 |
| 2. | Колба круглодонная | 4 | 179 | 18 |
| 3. | Стакан химический | 1 | 43 | 4 |
| 4. | Колба круглодонная | 3 | 66 | 7 |
| 5. | Воронка | 1 | 28 | 3 |
| 6. | Весы аналитические (Sartorius) | 1 | 710000 | 35500 |
| 7. | Плитка нагревательная НР-20А | 1 | 15200 | 1013 |
| Итого | | | | 36602 |

Для оборудования нужно рассчитать величину годовой амортизации по следующей формуле:

$$A_{год} = \frac{C_{перв}}{T_{ни}}, \quad (3)$$

где $C_{перв}$ – первоначальная стоимость, руб; $T_{ни}$ – время полезного использования, год.

Результаты расчетов приведены в таблице 28.

4.9.3 Расчет основной заработной платы

Основная заработная плата ($Z_{\text{осн}}$) руководителя (инженера) от предприятия (при наличии руководителя от предприятия) рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}}, \quad (5)$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата одного работника;

$T_{\text{р}}$ – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн. ;

$Z_{\text{дн}}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

$$Z_{\text{м}} = Z_{\text{б}} \cdot (k_{\text{пр}} + k_{\text{д}}) \cdot k_{\text{р}}, \quad (6)$$

где $Z_{\text{б}}$ – базовый оклад, руб.;

$k_{\text{пр}}$ – премиальный коэффициент, (определяется Положением об оплате труда);

$k_{\text{д}}$ – коэффициент доплат и надбавок (в НИИ и на промышленных предприятиях – за расширение сфер обслуживания, за профессиональное мастерство, за вредные условия: определяется Положением об оплате труда);

$k_{\text{р}}$ – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Для инженера оклад составляет $Q_{\text{инж}} = 14874$ руб/мес, для руководителя $Q_{\text{рук}} = 34596$ руб/мес. $Q_{\text{дипл.}} = 3000$. На выполнение НИР понадобилось 132 дня.

$$Z_{\text{м Руководителя}} = 34596 \cdot 1.3 = 44974,8$$

$$Z_{\text{м инженера}} = 14874 \cdot 1.3 = 19336,2$$

$$Z_{\text{м дипломник}} = 3000 \cdot 1.3 = 3900$$

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}}, \quad (7)$$

где $Z_{\text{м}}$ – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 24 раб.дня $M = 11,2$ месяца, 5-дневная неделя;

при отпуске в 48 раб.дней $M = 10,4$ месяца, 6-дневная неделя;

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб.дн.

Таблица 29 – Баланс рабочего времени

| Показатели рабочего времени | Инженер | Руководитель | Дипломник |
|--|---------|--------------|-----------|
| Календарное число дней | 132 | 132 | 132 |
| Количество нерабочих дней | 46 | 46 | 46 |
| - выходные дни | 40 | 40 | 40 |
| - праздничные дни | 6 | 6 | 6 |
| Потери рабочего времени | | | |
| - отпуск | | | |
| - невыходы по болезни | | | |
| Действительный годовой фонд рабочего времени | 252 | 252 | 252 |

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 30.

Таблица 30 – Расчет основной заработной платы

| Категория | $Z_{мс}$, руб. | k_o | k_p | Z_m , руб. | $Z_{он}$, руб. | T_p , раб. дн. | $Z_{осн}$, руб. |
|--------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|------------------|------------------|
| Руководитель | | | | | | | |
| ППСЗ | 34596 | 0,35 | 1,3 | 44974 | 928 | 132 | 122496 |
| Инженер | | | | | | | |
| ППСЗ | 14874 | 0,35 | 1,3 | 19336 | 400 | 132 | 52800 |
| Бакалавр | | | | | | | |
| ППС1 | 3000 | 0,35 | 1,3 | 3900 | 81 | 132 | 10692 |

Общая заработная исполнителей работы представлена в таблице 31.

Таблица 31 – Общая заработная плата исполнителей

| Исполнитель | $Z_{осн}$, руб. | $Z_{доп}$, руб. | $Z_{зн}$, руб. |
|--------------|------------------|------------------|-----------------|
| Руководитель | 122496 | 18374,4 | 140870,4 |
| Инженер | 52800 | 7920 | 60720 |
| Бакалавр | 10692 | 1603,8 | 12295,8 |

4.9.4 Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

Отчисления на социальные нужды составляет 30,5 % от суммы заработной платы всех сотрудников. Отчисления на социальные нужды составляет: отчисления в пенсионный фонд 22 %, отчисление на социальное

страхование 2,9%, отчисление на медицинское страхование 5,1 %. 0,5% страхование жизни, от несчастного случая.

Рассчитываем затраты на отчисление на социальные нужды по формуле:

$$Z_{o.c.n.} = 0,3 \cdot (Z_{осн.рук.} + Z_{осн.инж.}), \quad (8)$$

где $Z_{o.c.n.}$ – затраты на отчисления на социальные нужды, руб.

$$Z_{o.c.n.} = 0,305 \cdot (122496 + 52800 + 10692) = 56726,34.$$

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Отчисления во внебюджетные фонды

| Исполнитель | Основная заработная плата, руб. | Дополнительная заработная плата, руб. |
|--|---------------------------------|---------------------------------------|
| Руководитель проекта | 122496 | 18374,4 |
| Инженер | 52800 | 7920 |
| Бакалавр | 10692 | 1603,8 |
| Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды | 0,30 | |
| Итого: | 56726,34 | |

4.9.5 Накладные расходы

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование графических материалов, оплата услуг связи, электроэнергии, транспортные расходы и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{накл} = k_{нр} \cdot (\text{сумма статей } 1 \div 5),$$

где $k_{нр}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов $k_{нр}$ допускается взять в размере 16%. Таким образом, накладные расходы на данные НТИ составляют 49933,7 руб.

4.9.6 Формирование бюджета затрат НТИ

Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в качестве нижнего предела затрат на разработку научно-технической продукции.

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект приведен в таблице 33.

Таблица 33 – Расчет бюджета затрат НТИ

| Наименование статьи | Сумма, руб. | | |
|--|-------------|----------|----------|
| | Исп.1 | Исп.2 | Исп.3 |
| 1. Материальные затраты НТИ | 4871 | 4511 | 5277 |
| 2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ | 36602 | 36602 | 36602 |
| 3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы | 185988 | 185988 | 185988 |
| 4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы | 27898,2 | 27898,2 | 27898,2 |
| 5. Отчисления во внебюджетные фонды | 56726,34 | 56726,34 | 56726,34 |
| 6. Накладные расходы | 49933,7 | 49876,1 | 49998,6 |
| 7. Бюджет затрат НТИ | 227461 | 227101 | 227867 |

4.10 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{\Phi_{\text{pi}}}{\Phi_{\text{max}}}, \quad (9)$$

где $I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i}$ – интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i -го варианта исполнения;

Φ_{\max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (10)$$

где I_{pi} – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов;

a_i – весовой коэффициент i -го варианта исполнения разработки;

b_i^a, b_i^p – балльная оценка i -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности рекомендуется проводить в форме таблицы (таблица 34).

Таблица 34 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

| ПО Критерии | Весовой коэффициент параметра | Исп.1 | Исп.2 | Исп.3 |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| 1. Удобство в эксплуатации | 0,2 | 5 | 4 | 3 |
| 2. Наличие оборудования | 0,2 | 4 | 2 | 5 |
| 3. Экспресность выполнения анализа | 0,2 | 3 | 3 | 4 |
| 4. Энергосбережение | 0,2 | 5 | 3 | 2 |
| 5. Материалоемкость | 0,2 | 5 | 3 | 4 |
| ИТОГО | 1 | 4,4 | 3,0 | 3,6 |

Интегральный показатель эффективности разработки ($I_{финр}^p$) и аналога ($I_{финр}^a$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{исп.1} = \frac{I_{p-исп1}}{I_{финр}^{исп.1}}, \quad I_{исп.2} = \frac{I_{p-исп2}}{I_{финр}^{исп.2}} \dots \quad (11)$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта. Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{исп.1}}{I_{исп.2}} \quad (12)$$

где \mathcal{E}_{cp} – сравнительная эффективность проекта; $I_{мэ}^p$ – интегральный показатель разработки; $I_{мэ}^a$ – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Таблица 35 – Сравнительная эффективность разработки

| Показатели | Исп.1 | Исп.2 | Исп.3 |
|---|-------|-------|-------|
| Интегральный финансовый показатель разработки | 0,56 | 0,78 | 1 |
| Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки | 4,4 | 3,0 | 3,6 |
| Интегральный показатель эффективности | 7,8 | 3,0 | 4,6 |
| Сравнительная эффективность вариантов исполнения | 1 | 1,7 | 2,6 |

Сравнение значений интегральных показателей эффективности показывают, что наша разработка нового метода выделения зонгорина на модифицированном азоэпоксиадсорбенте (исп.1) имеет более эффективный вариант решения поставленной технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности.

ГЛАВА 5 СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

В рамках бакалаврской работы в соответствии с темой работы “Получение каллусной культуры *Aconitum barbatum*, продуцента фармакологически ценных алкалоидов” исследования проводились в лаборатории, расположенной в аудитории 221 на втором этаже 2-го учебного корпуса Томского политехнического университета. Лабораторная мебель состоит из шкафов для хранения приборов, столов обыкновенных, материалов и книг и разного рода табуретов, стульев подставок. Рядом со столом устраивается сточная раковина. В лаборатории находится следующее оборудование: электронные весы, капиллярный электрофорез, вольтамперометрический анализатор, лабораторный дистиллятор, стационарные компьютеры и т. д. Освещение рабочего места комбинированное – сочетание естественного света из окон и искусственного освещения люминесцентных ламп. Лаборатория оснащена системой вентиляции и отопления.

Федеральный закон Российской Федерации N 426-ФЗ устанавливает правовые и организационные основы и порядок проведения специальной оценки условий труда, определяет правовое положение, права, обязанности и ответственность участников оценки условий труда. СН 2.2.4/2.1.8.562 – 96 нормирует шум на рабочих местах, в помещениях жилых, общественных зданий и на территории застройки. Нормы СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278 – 03 устанавливают гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий.

5.1 Анализ вредных и опасных факторов

На всех этапах выполнения данная работа связана с использованием вредных и отравляющих веществ.

Опасные вещества проникают в организм человека в основном через дыхательную систему, а также через кожный покров и пищу. Воздействие данных отравляющих веществ определяют не только свойствами самого вещества, но и особенностями организма человека [58].

Таблица 36 – Характеристика веществ, применяемых для работы

| Вещества | Физические свойства | Пдк,/м | Класс опасности | Общая характеристика токсического действия |
|-----------------------------------|---|----------|-----------------|--|
| Нитрат аммония | Кристаллическое вещество белого цвета | Более 10 | 4 | Вдыхание пыли нитрата аммония не приносит большого вреда, однако при попадании на части тела человека, которые имеют повышенную потливость, может вызывать дерматит и раздражение. |
| Нитрат калия | Бесцветные кристаллы | 1,1-10,0 | 3 | Опасен при вдыхании, попадании на кожу и в глаза. |
| Кальций хлористый 2-водный | Пористые кусочки белого цвета | 1,1-10,0 | 3 | При систематическом воздействии раздражает и осушает кожу, особенно раздражающе действует на слизистые оболочки верхних дыхательных путей и глаз. |
| Магний сернокислый 7-водный | Белый кристаллический порошок | Более 10 | 4 | При попадании на кожу вызывает кожные заболевания. |
| Калий фосфорнокислый 1-замещенный | Порошок белого цвета | 1,1-10,0 | 3 | Вызывают злокачественные образования, заболевания ЖКТ |
| Иодид калия | Белый или грязно-белый кристаллический порошок. | 1,1-10,0 | 3 | Может привести к угнетению функции щитовидной железы, гастроэнтерит |
| Борная кислота | Бесцветное кристаллическое вещество в виде чешуек | 1,1-10,0 | 3 | Нарушают клеточный обмен, в особенности обмен нервных клеток. |
| Марганец сернокислый | Кристаллы от белого до розового цвета | 1,1-10,0 | 3 | Вызывает заболевания ЖКТ |
| Цинк сернокислый 7-водный | Бесцветные прозрачные призматические кристаллы | 0,1-1,0 | 2 | Повышают заболеваемость органов дыхания, пищеварения, кровообращения |

| | | | | |
|--|---|----------|---|--|
| Натрий молибденов окислый 2-водный | Белый кристаллический порошок | 1,1-10,0 | 3 | Действует на нервную систему, нарушает обмен веществ |
| Медь сернокислая 5-водная | Порошок, состоящий из кристалликов лазурно-синего цвета | 1,1-10,0 | 3 | Вызывает желудочно-кишечные расстройства, кашель, затрудненное дыхание, боли в животе, тошнота, рвота, покраснение кожи, боль, отек, краснота, слезотечение. |
| Кобальт Хлористый (II) 6-водный | Красно-фиолетовые кристаллы | 0,1-1,0 | 2 | Потерю аппетита, рвоту, покраснение лица и конечностей, а также острый дерматит. |
| Железо сернокислое 7-водное | Зеленовато-голубые кристаллы | 1,1-10,0 | 3 | Вызывает тошноту, рвоту, диарею, незначительное раздражение кожи. |
| Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты | Белый кристаллический порошок | 0,1-1,0 | 2 | Может вызвать раздражение кожных покровов, слизистых оболочек глаз и дыхательных путей и симптомы бронхита. |
| Серная кислота | Маслянистая прозрачная жидкость | 0,1-1,0 | 2 | Раздражает дыхательные пути, вызывает ожоги кожи |
| Хлороформ | Бесцветная летучая жидкость | 0,1-1,0 | 2 | Вызывает поражения печени и почек |
| Хлорид натрия | Белое твердое вещество | 1,1-10,0 | 3 | Вызывает гипертонию, мигрень, набор лишнего веса |
| Гидроксид аммония | Водный раствор аммиака | 1,1-10,0 | 3 | Раздражает слизистую оболочку пищеварительного тракта |
| Никотиновая кислота | Прозрачная жидкость | Более 10 | 4 | Аллергические реакции, раздражения |
| Пиридоксин -HCl | Прозрачная жидкость | Более 10 | 4 | Аллергические реакции, развивается анемия, нарушается координация движений и появляется онемение конечностей |
| Тиамин -HCl | Прозрачная жидкость | Более 10 | 4 | Аллергические реакции и спазматические головные боли, тошнота, рвота, крапивница |
| Глицин | Кристаллический продукт светло-серого или белого цвета. | 1,1-10,0 | 3 | Аллергические реакции, при длительном применении может провоцировать образование камней в почках. |

| | | | | |
|-----------|----------------------------|----------|---|---|
| Сахароза | Бесцветные кристаллы | Более 10 | 4 | Может обострить астму; вызывать психические заболевания; повышать количество перепадов настроения; питать нервные расстройства. |
| Агар-агар | Порошок бело-желтого цвета | Более 10 | 4 | Может привести к обильной и продолжительной диарее, а также существует риск нарушения бактериального соотношения в кишечнике - а это может стать причиной возникновения различных инфекций. |

Снизить содержание вредного вещества в воздухе рабочей зоны позволяют следующие мероприятия:

1. Исключить использование или заменить вредное вещество менее вредным;
2. Герметизация оборудования;
3. Устройство различных систем вентиляции;
4. Использовать средства индивидуальной защиты (респираторы, резиновые перчатки, спецодежда).

5.2 Микроклимат

Микроклимат производственной среды в соответствии с ГОСТ 12.1.005-88 подразумевает сочетание температур, относительную влажность воздуха и интенсивность тепловых излучений. Приведенные параметры оказывают влияние на функциональные возможности деятельности человека, его здоровье, надежность работы и самочувствие.

В лаборатории, где проводят основные испытательные работы могут возникнуть факторы, влияющие на отклонение нормы влажности и температуры. Это приводит к дискомфортным условиям работы. Для создания комфортного рабочего места необходимо оснастить его мягким креслом.

По энерго затратам организма работу разделяют на три категории тяжести. Работу, лаборантов – разработчиков, относят к категориям легких. Те

минимально допустимые значения микроклимата для этого случая приведены в таблице 37, согласно СанПиН 2.2.4.548 – 96 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений».

Таблица 37 – Основные требования к микроклимату

| Временной период | Категории работ по уровню энерго затрат, Вт | Температура, °С | Относительная влажность, % | Скорость движения воздуха, м/с |
|------------------|---|-----------------|----------------------------|--------------------------------|
| Холодный | Ia (до 139) | 20 – 22 | 15 - 60 | 0,1 |
| Теплый | Ia (до 139) | 22 – 23 | 15 - 75 | 0,1 |

Температура в рабочей зоне поддерживается отоплением в холодный период года и вентиляцией в теплый период.

Для того чтобы поддерживать нормальные параметры микроклимата в лаборатории необходимо установить:

- устройство систем вентиляции;
- кондиционирование воздуха. [59]

В лаборатории используется вентиляция, предназначенная для удаления из рабочей зоны загрязненного воздуха. В работающих условиях есть как естественная вентиляция, осуществляющаяся через окна, двери, форточки и искусственная, которая представлена в виде местной вентиляции – вытяжной, где загрязненный воздух удаляется от места его возникновения вентиляторами. Для этого применяют вытяжной шкаф, внутри которого проводят работу с химическими реактивами.

Помещение, где находится рабочее место, должны соответствовать нормам, количеству размещенного в нем оборудованию и размерам (объем, площадь) по количеству рабочих мест.

Нормальные условий труда согласно СанПиН 2.2.4.548 – 96 (Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений) устанавливает, что на одно рабочее место должно отводиться не менее 4,5 м² площади в помещение и 20 м³ воздуха. Площадь данного помещения составляет 30м², объем 100 м³. В данном помещении работают 4 человека, соответственно

на одного человека приходится $6,6 \text{ м}^2$ и 25 м^3 воздуха. Это соответствует санитарным нормам.

5.3 Освещенность

Применение на рабочих местах одного местного освещения не допускается. Общее же равномерное освещение применяется для тех помещений, где работа производится по всей площади, и нет необходимости в лучшем освещении отдельных участков.

Система общего локализованного освещения применяется тогда, когда в производственном помещении есть участки, на которых проводятся работы с высоким зрительным напряжением.

Система комбинированного освещения применяется в помещении, где выполняются точные зрительные работы; в случае необходимости определенного, изменяемого в процессе работы направления света, а так же в помещениях с не высокой плотностью распределения рабочих мест.

5.3.1 Выбор осветительных приборов

При выборе осветительного оборудования необходимо учесть условия среды, светотехнические требования и экономические показатели.

Люминесцентные лампы - открытые двухламповые светильники типа ОД, ОЛОП, ОДО, ШОД, ООД - для нормальных помещений с хорошим отражением стен и потолка; их применение допускается при умеренной влажности и запыленности.

При выполнении измерений в лаборатории освещенность рабочего места должна быть согласно СНиП 25-05-95 в пределах 400 лк. Обеспечить это требование естественным освещением практически невозможно, поэтому должно применяться комбинированное освещение. В данной лаборатории для освещения применяются люминесцентные лампы низкого давления с

исправленной цветностью ЛДЦ и дневного света ЛД со светильниками рассеянного типа ОД.

Контроль искусственного и естественного освещения производственных помещений необходимо проводить не реже одного раза в год при помощи люксметра.

5.4 Виброакустические факторы

Вибрации и шум, ухудшающие условия труда, оказывают вредоносное воздействие на человека. При продолжительном воздействии шума на организм происходят не желательные явления:

- снижение зрения и слуха;
- повышение кровяного давления;
- снижение уровня внимания.

Измерение шума проводят с целью оценки его на рабочих местах или рабочих зонах для сопоставления с требованиями санитарных норм, а также для оценки шумовых характеристик оборудования, с целью разработки мероприятий по борьбе с шумом. Оценка шума производится с использованием частотного спектра измеренного уровня звукового давления, выражаемого в дБ в активных полосах частот, которые сравнивают с предельными спектрами.

Уровни шума не должны превышать значений установленных в ГОСТ 12.1.003 – 83 и ГОСТ 17187 – 81, и проводится не реже двух раз в год.

По СН 3223 – 85 нормируются параметры шума и составляют:

- для лаборатории ПДУ составляет 75 дБ;
- для вентиляции ПДУ составляет 70 дБ.

По уровню шума, локальной и общей вибрации инфра- и ультра звука данная лаборатория с вышеперечисленным оборудованием относится к допустимому классу, ПДУ <25 дБА, что соответствует требованиям безопасного нахождения в лаборатории установленного в этом стандарте. Контроль шума осуществляется шумомером.

5.5 Электробезопасность

Основной причиной воздействия электрического тока на организм человека являются: напряжение, возникнувшее в результате повреждения изоляции на металлических частях оборудования. Наибольшую опасность при эксплуатации электрических устройств и проведении ремонтно-профилактических работ представляет поражение электрическим током вследствие присоединения к токоведущим частям аппаратуры и к частям прибора, находящимся под напряжением.

Поражающее воздействие электрического тока напрямую зависит от длительности и значения протекания электрического тока через организм человека, частоты и рода тока, места прохождения через тело человека, индивидуального состояния человека. Наибольшую опасность для организма человека представляет переменный ток с частотой от 20 до 100 Гц.

Мероприятия, проводимые для устранения факторов поражения электрическим током:

а) все лица, приступающие к работе с электрооборудованием, проходят инструктаж на рабочем месте, допуск к самостоятельной работе разрешается лишь после проверки знаний техники безопасности;

б) осуществляется постоянный контроль качества и исправности защитных приспособлений и заземлении, ремонтно-наладочные работы на действующих электроустановках производится только с использованием защитных средств;

в) эксплуатация электроустановок предусматривает введение необходимой технической документации; обеспечивается недоступность к токоведущим частям, находящимся под напряжением; корпуса приборов и электроустановок заземляются.

Установление предельно допустимых уровней (ПДУ) напряжения и тока согласно ГОСТ 12.1.038 – 82. Защитные мероприятия от поражений электрическим током – защитное заземление ГОСТ 12.1.030-81. Принцип

действия защитного заземления: человек должен стоять внутри контура заземления и при попадании фазного напряжения на заземленный корпус прибора, под фазным напряжением окажется как корпус прибора, так и участок земли, на которой стоит человек.

5.6 Техника безопасности при проведении эксперимента

В ходе проведения исследований необходимо соблюдать технику безопасности, во избежание несчастных случаев.

Чтобы избежать воздействия опасных и вредных факторов, необходимы организационные, профилактические мероприятия. Без ознакомления с инструкцией по технике безопасности перед выполнением НИР, работа в лаборатории запрещена.

При работе в лаборатории согласно Техническому Регламенту «О безопасности средств индивидуальной защиты», сотрудники и студенты должны иметь специальную одежду: халат, обувь, а также при необходимости средства индивидуальной защиты (очки, перчатки). [60]

При проведении НИР используется серная кислота и щелочь – NH_4OH . Щелочи и кислоты в большинстве случаев относят к веществам с повышенной опасностью и способным вызывать химические ожоги и отравления.

Для работ с ними необходимо соблюдать следующие требования:

1. Кислоты и щелочь следует переливать с помощью ручных насосов или сифонов с грушей.
2. Разливать концентрированную кислоту необходимо в вытяжном шкафу при включенной вентиляции.
3. Приготовление растворов серной кислоты необходимо приливать в воду тонкой струйкой кислоту при перемешивании. Приливать воду в кислоту запрещается.
4. Разлитые кислоты или щелочи необходимо засыпать песком и лишь после этого производить уборку.

5.7 Охрана окружающей среды

В настоящее время в нашей стране уделяется большое внимание организации разумного взаимодействия природы и общества. Комплексное использование сырья прогрессивно с точки зрения экономики и охраны окружающей среды. Специфической чертой развития является ориентация на безотходное производство.

Вредные вещества могут попадать в окружающую среду по сточным водам в виде пыли, дыма, газа, твердых отходов производства.

Необходимо совершенствовать технологические процессы с целью сохранения окружающей среды от вредных выбросов. Комплексное использование сырья прогрессивно с позиции экологии. Разработаны безотходные технологии, позволяющие вернуть отходы вновь в производство.

Для предотвращения негативных воздействий проводится организации раздельного сбора и хранения неорганических и органических отходов, обезвреживание кислых и щелочных стоков согласно утвержденным инструкциям, регенерация растворителей. Отходы подвергаются переработке, утилизации и захоронению. Существуют системы сжигания опасных отходов, создаются полигоны по обезвреживанию и захоронению токсичных отходов. Полигоны должны располагаться вдали от водоохраных зон и иметь санитарно-защитные зоны. В местах складирования выполняется гидроизоляция для исключения загрязнения грунтовых вод.

5.8 Требования безопасности в аварийных ситуациях

Одним из важнейших факторов в безопасности жизнедеятельности людей является подготовленность к чрезвычайным ситуациям.

Чрезвычайная ситуация (ЧС) – это совокупность таких обстоятельств, которые сопровождаются разрушениями зданий, сооружений, материальных ценностей, поражению и гибелью людей.

Чрезвычайную ситуацию можно квалифицировать следующим образом:

1. ЧС, связанная с производственными авариями (пожары, взрывы, выброс вредных веществ в окружающую среду);
2. ЧС, связанная со стихийными бедствиями (землетрясения, наводнения, ураганы, смерчи, снежные бури, заносы, оползни, обвалы, эпидемии, лесные и торфяные пожары);
3. ЧС конфликтного характера (вооруженное нападение, выступление экстремистских групп вызванные волнения в отдельных районах).

При выполнении дипломной работы может возникнуть чрезвычайная ситуация замыкание проводки и возгорание. По возможности, пламя необходимо потушить песком, но перед этим необходимо сообщить руководителю. Соблюдая все правила с электрическим оборудованием можно избежать ЧС.

5.9 Пожарная безопасность

Все лабораторные помещения должны соответствовать требованиям пожарной безопасности согласно ГОСТ 12.1.004-91 и иметь необходимые средства противопожарной безопасности согласно ГОСТ 12.4.009-83.

Помещения лабораторий по степени пожароопасности относятся к классу П-2, так как в нем присутствует выделение пыли и волокон во взвешенном состоянии (в ред. Федерального закона от 10.07.2012 N 117-ФЗ). Лаборатории должны быть оснащены пожарными кранами (в количестве не менее одного на этаж) с пожарными рукавами необходимой длины. Каждое рабочее помещение должно быть оснащено песком и огнетушителями, а помещения с легковоспламеняющимися и огнеопасными веществами - дополнительными средствами пожаротушения. На видном в помещении лаборатории должен быть висеть план эвакуации. Необходимо назначить из числа сотрудников группу (2 - 5 человек), которая сможет организовать мероприятие противопожарной безопасности, получив предварительно

инструктаж от местной команды пожарных. Каждый сотрудник лаборатории должны быть ознакомлен с правилами обращения с взрыво- и огнеопасными веществами, газовыми приборами, а также использовать противогаз, огнетушитель и другие средства пожаротушения, имеющимися в наличие лаборатории. В лаборатории, а также в непосредственной близости от них (под лестницами, в коридорах) строго запрещается хранение горючих материалов, и установление предметов, загромождающих пути эвакуации и доступа к средствам пожаротушения. Курение разрешается только в специально отведенных и оборудованных зонах. Курение в лаборатории воспрещается. Отсутствие разрешения начальника или сотрудника, отвечающего за противопожарную безопасность, запрещается установление нагревательных и лабораторных приборов, запуск в эксплуатацию. Нагревательные приборы необходимо установить на термостойкую подставку. Строго запрещена эксплуатация неисправных нагревательных и лабораторных приборов. Сотрудники лаборатории, заметивший задымление, пожар или другие признаки пожара обязаны:

- незамедлительно сообщить в пожарную часть по телефону;
- принять всевозможные меры по недопущению распространения огня;
- известить начальника лаборатории, в свою очередь который обязан известить сотрудников, принять меры по ликвидации пожара к их эвакуации;
- знать и уметь пользоваться первичными средствами пожаротушения.

Для тушения пожаров, в случае их возникновения, в лаборатории имеются следующие средства:

- огнетушитель ОХП-10, предназначенный для тушения пожаров твердых горючих материалов, легковоспламеняющихся и горючих жидкостей;
- огнетушитель ОВП-10, предназначенный для тушения различных веществ и материалов, за исключением щелочных металлов и веществ, горение которых происходит без доступа воздуха, а также электроустановок, находящихся под напряжением [61].

В лаборатории имеются огнетушителей марки ОХП-10 и ОВП-10 предназначены для тушения загорания различных веществ и материалов, за исключением щелочноземельных элементов, а также электроустановок под напряжением до 1000 В. При загорании снять огнетушитель, поднести к очагу загорания, не менее 1 метра, прочистить спрыск иглой или гвоздем, повернуть рычаг до отказа до 180°, перевернуть огнетушитель вверх дном и направить струю на огонь. Действие огнетушителя 60 секунд, длина струи пены 6-8 метров. Выход пены из огнетушителя 50 литров.

5.10 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

В целях сохранения и повышения работоспособности, ускорения адаптации к действию неблагоприятных условий труда, профилактики заболеваний, работающим в контакте с химическими веществами следует проводить витаминизацию [62].

Работникам, занятым в производствах, профессиях и должностях, выдаются бесплатно только витаминные препараты в составе продуктов диетического (лечебного и профилактического) питания при вредных условиях труда.

Выдача витаминных препаратов производится в составе продуктов для диетического (лечебного и профилактического) питания вредных условиях труда организациями общественного питания, в соответствии с утвержденными нормами и с учетом питьевого режима работников, подвергающихся воздействию высокой температуры окружающей среды и интенсивному теплооблучению.

Создание здоровых условий труда лиц, работающих в особо вредных условиях с воздействием высокой температуры и интенсивного теплооблучения, требует решения двух задач, связанных с использованием

диетических (лечебных и профилактических) продуктов: выдачи витаминов и обеспечение питьевого режима.

Для обеспечения питьевого режима и восполнения потерь биологически активных веществ с потом компанией «ЛЕОВИТ нутрио» разработан специальный напиток VitaPRO «Напиток витаминный».

Задачу выдачи витаминов решает использование диетических (лечебных и профилактических) продуктов - киселей и компотов «ЛЕОВИТ» «При вредных условиях труда» для витаминизации рационов лечебно-профилактического питания.

Руководители организаций и специалисты, ответственные за принятие решений при осуществлении хозяйственной и иной деятельности, которая оказывает или может оказать негативное воздействие на окружающую среду, должны иметь подготовку в области охраны окружающей среды и экологической безопасности.

В соответствии с техническим регламентом каждому работнику лаборатории выдаются средства индивидуальной защиты и смывающие вещества в соответствии с нормами выдачи на 1 работника в месяц. Для исключения возможности несчастных случаев должны проводиться обучение, инструктажи и проверка работников на знание требований безопасности труда. За государственный и ведомственный контроль по охране труда отвечает штаб ГО ЧС, отдел по охране труда.

Федеральный закон Российской Федерации N 426-ФЗ устанавливает правовые и организационные основы и порядок проведения специальной оценки условий труда, определяет правовое положение, права, обязанности и ответственность участников оценки условий труда [63].

При выполнении данной работы были использованы следующие виды средства индивидуальной защиты: перчатки из латекса, спецодежда. Также обязательно проводятся технологические перерывы и регулярное проветривание помещения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение каллусной культуры *Aconitum barbatum* проводилось на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга.

Оптимальной средой для получения каллусной культуры является питательная среда МС, содержащая 30 г сахарозы, 8 г агара, фитогормоны со следующей концентрацией: 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП.

Жизнеспособность клеток во всех вариантах сред на протяжении всего периода культивирования в среднем составляла 53%. Установлено, что жизнеспособность каллусной культуры и прирост её биомассы выше на среде 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. При концентрации же 1,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП наблюдалась высокая обводненность клеточной культуры, что приводило к гибели клеток.

Следует отметить, что в каллусной культуре *Aconitum barbatum* преобладают клетки вытянутой формы. Также в культуре наблюдалось формирование сосудистой ткани на всех этапах культивирования во всех вариантах сред, которое увеличивалось на протяжении всех пассажей от 5 до 30%.

Выделение суммы алкалоидов из каллусной культуры и растительного сырья *Aconitum barbatum* проводилось с помощью трехкратной экстракции хлороформом. После экстракции полученную смесь алкалоидов *Aconitum barbatum* разделяли методом жидкостной колоночной хроматографии на азопоксиадсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ. Содержание алкалоидов в растительном сырье и культуре тканей определяли с использованием УФ/вид-спектрофотометра при длине волны 200-800 нм.

Таким образом было установлено, что в культуре тканей содержатся алкалоиды типа: зонгорин, напеллин, N-окись 12-эпинапеллин и мезаконитин. Также следует отметить, что в культуре тканей алкалоид атизиновой группы - зонгорин содержится в большем количестве, чем в растительном сырье.

В будущем планируется идентифицировать полученные алкалоиды методами ТСХ, ВЭЖХ и ИК-спектроскопией.

Для дальнейшего экспериментального исследования и создания на их основе лекарственных препаратов противовоспалительной и противоопухолевой направленности наиболее перспективными являются такие атизиновые алкалоиды, как зонгорин, напеллин и N-окись 12-эпинапеллин, которые проявляют высокий терапевтический эффект и обладают низкой токсичностью.

Также в ходе данной работы были определены ресурсная, финансовая, социальная и экономическая эффективности исследования и рассчитан бюджет научно-исследовательского проекта.

Рассмотрены условия проведения экспериментов и вредные факторы, возникающие в процессе работы и возможность защиты от них.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейство Magnoliaceae – Limoniaceae. // Л.: Наука, 1985. – 37 с.
2. Ткаченко К. Г. Аконит: целительные рецепты // К. Г. Ткаченко. – СПб.: Издательский Дом «Нева», 2005. – 128 с.
3. Гринкевич Н. И., Сорокина А. А. Легенды и быль о лекарственных растениях. // М.: Наука, 1988. – 176 с.
4. Фруентов Н. К., Кадаев Г. Н. Ядовитые растения: Медицинская токсикология растений Дальнего востока. // Хабаровское книжное издательство, 1971. – 256 с.
5. Ворошилов В.Н. Сибирские виды рода *Aconitum* // Бюлл. ГБС АН СССР. – 1967. – № 4. – 33–40 с.
6. Корзунова А. Н. Аконит: лекарственный щит от неизлечимых недугов // А. Н. Корзунова. – М.: Изд-во Эксмо, 2005. – 96 с.
7. Алефиров А. Н. Борец за жизнь. Аконит // А. Н. Алефиров. – СПб.: ИД «Весь», 2002. – 192 с.
8. Гаммерман А. Ф., Гром И. И. Дикорастущие лекарственные растения СССР. // М. Медицина, 1976. – 286 с.
9. Ворошилов В. Н. Определитель растений советского Дальнего Востока. – М.: Наука, 1982.– 265–273 с.
10. Черепанов С. К. Сосудистые растения СССР. // М. Наука, 1981. – 509 с.
11. Ресурсы лекарственных растений Бурятии / Т. А. Асеева, З. В. Тармаева, О. В. Логина и др. // Растительные ресурсы Забайкалья и их использование. – Улан-Удэ, 1987. – 41–61 с.
12. Пастушенков Л. В., Пастушенков А. Л., Пастушенков В. Л. Лекарственные растения: использование в народной медицине и быту. // Л.: Лениздат, 1990. – 384 с.

13. Асеева Т. А, Блинова К. Ф., Яковлева Т. П. Лекарственные растения тибетской медицины. // Новосибирск Наука. – 1985. – 160 с.
14. Бондаренко Д.А., Дьяченко И.А., Скобцов Д.И., Мурашев А.Н. // Биомедицина. 2011. Т. 1, №2. 84-94 с.
15. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В 2 томах. // М., 2002.
16. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейство Magnoliaceae – Limoniaceae. // Л.: Наука, 1985. – 37 с.
17. Елисеев Ю. Ю. Осторожно аконит // Ю. Ю. Елисеев. – М.: Изд-во Эксмо, 2005. – 96 с.
18. Дьячковская Т. Б. К изучению алкалоидоносности представителей родов *Aconitum* и *Delphinium* Горного Алтая // Растительные ресурсы. –1971. – Т. 7. – № 4. – 524–530 с.
19. New flavonoid oligoside from *Aconitum barbatum* Pers./Pogodaeva, N.N., Fedorov, S.V., Kanitskaya, L.V., Semenov, A.A./Russian Chemical Bulletin– 2000.– №11.– 1905-1907 pp.
20. Погодаева Н. Н., Жапова Ц., Семенов А. А. Дитерпеновые алкалоиды. Определение базисности констант // Междунар. конф. природных соедин. и физиол. действ. веществ, Новосибирск. 6 декабря, 1998: Тез. докл. – Новосибирск, 1998. – 158 с.
21. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейство Magnoliaceae. // Л.: Наука, 1984. – 460 с.
22. Бессонова И. А., Саидходжаева Ш. А. Дитерпеновые алкалоиды гетизанового типа // Хим. природ. соединений. – 2000. – № 5. – 345–374 с.
23. Алкалоидный состав некоторых видов *Aconitum* L. флоры Сибири / Н. Н. Погодаева, Ц. Жапова, А. Л. Верещагин и др. // Раст. ресурсы. – 2000. – Т. 36. – № 2. – 79–84 с.
24. Голубев Н. М. Об алкалоидном составе некоторых аконитов Дальнего Востока // Вопросы фармации на Дальнем Востоке. – Хабаровск, 1973. – Вып. 1. – 82 с.

25. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейство Asteraceae (Compositae). – // СПб. Наука, 1993. – 352 с.
26. Wei Xiao-yi, Wei Bi-yu, Zhang Li. Novel diterpenoid alkaloids from *Aconitum leucostomum* // *Zhiwu xuebau - Acta Bot. sin – Occident. Sin* – 1996. – Vol. 38, № 12. – P. 995–997.
27. Chemical stimulation of seed germination in *Aconitum heterophyllum* Wall. and *A. balfourii* stapf.: Important Himalayan species of medicinal value / H. Pandey, S. K. Nandi, M. Nadeem, L. M. S. Palni // *Seed Sci. and Technol.* – 2000. – 25, № 1. – 39–40 pp.
28. Алкалоиды *Aconitum barbatum*. Строение батаконина / Н. Батбаяр, Д. Батрурен, М. Н. Султанходжаев, М. С. Юнусов // *Хим. природ. соедин.* – 1987. – № 2. – 237–239 с.
29. Гусева А. П. Применение важнейших лекарственных растений тибетской медицины по рецептам врача П. А. Бадмаева/ Элеутерококк и другие адаптогены из дальневосточных растений. // Владивосток, 1966. – 309–329 с.
30. Anxiolytic Activity of Diterpene Alkaloid Songorine/ Nesterova, Y.V., Povet'eva, T.N., Suslov, N.I., Shults, E.E., Ziuz'kov, G.N., Aksinenko, S.G., Afanas'eva, O.G., Krapivin, A.V., Kharina, T.G. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* –2015. –№ 5. – 620–622 pp.
31. А.В. Бабилова, Т.Ю. Горпенченко, Ю.Н. Журавлев. Растение как объект биотехнологии: Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток, 2007 Вып. LV.
32. Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение в культуре ткани // *Культура клеток растений*. М.: Наука, 1981. 137-149 с.
33. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина. – 1978. – 391с.

34. Культура клеток растений и биотехнология. Под ред. Р.Г. Бутенко, 1986, М., Наука, 286 с.
35. Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии/ Под ред. Инге-Вечтомова С.Г. – Л.: Наука. - 1986.- 256с.
36. Повышение биосинтетической способности катарантуса розового (*Catharanthus roseus* L.DON) в условиях *in vitro*//Я.А. Болдырева, Н.А. Величко, «Биотехнология», 2002 г., №6, 35-40 с.
37. Изучение каллусной ткани *Aconitum septentrionale* Koelle: физиологические и генетические аспекты//И.Г. Мигранова автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Уфа – 2000 г.
38. Биотехнологические основы выращивания клеточной культуры стефании гладкой (*stephania glabra*), как продуцента алкалоида стефарина//Т.А. Савина автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва – 1992 г.
39. Носов А.М. Культура клеток высших растений - уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений, 1999., т.46, №6, 837-844 с.
40. Kataeva N.V., Alexandrova I.G., Butenko R.G., Dragavtzeva E. // Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro* // Plant Cell Tissue Organ Cultures, 1991, v.27, p.149-154.
41. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе, 1999, М, ФБК-ПРЕСС, 160 с.
42. Орехов А.П. Химия алкалоидов. 2-е изд., испр. и доп. // М. АН СССР, 1955. - 865 с.
43. Ресурсы лекарственных растений Бурятии / Т. А. Асеева, З. В. Тармаева, О. В. Логина и др. // Растительные ресурсы Забайкалья и их использование. – Улан-Удэ, 1987. – 41–61 с.
44. Якушкина, Н.И. Физиология растений / Н.И. Якушкина, Е.Ю. Бахтенко. – М.: Гуманитар. изд. центр ВЛАДОС, 2005. - 463 с.

45. Химический анализ лекарственных растений : справочное пособие // под ред. проф. Гринкевич Н. И. – М. : Высшая школа. – 1991. – 148 с.
46. Кузнецов, П. В. Эпоксифункционизированные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ // П. В. Кузнецов. – Кемерово: Кузбассвузиздат, 2002. – 104 с.
47. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. М: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
48. Головацкая И.Ф., Карначук Р.А. Свет и растение. Учебное пособие.- Томск: Изд-во Том. Ун-та. 1999.- 100 с.
49. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений, 1964, М. Наука, 350 с.
50. Самыгин Г.А., Волкова Л.А., Попов А.С. Сравнение разных методов для оценки жизнеспособности клеток суспензионных и каллусных культур // Физиология растений. 1985. Т. 32. 813-817 с.
51. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. М: Агропромиздат, 1980. — 304 с.
52. Цельникер, Ю.Л. Влияние интенсивности света на развитие ассимиляционной поверхности листа у саженцев древесных пород [Текст] / Ю.Л. Цельникер, И.С. Малкина // Лесоведение. – 1976. – № 3. – 65–69 с.
53. Ляпкина Н.С., Хадеева Н.В., Шаин С.С., Майсурян А.Н. Разработка методов культивирования тканей копеечника *in vitro* // Биотехнология. 1999. -№ 1. – 55-61 с.
54. Бондарев Н.И., Носов А.М., Корниенко А.В. Влияние экзогенных регуляторов роста на каллусогенез и рост культивируемых клеток *Stevia rebaudiana* // Физиология растений, –1998. Т. 45. - №6. – 888-892 с.
55. Багратишвили Д.Г., Запрометов М.Н., Бутенко Р.Г. Получение суспензионной культуры клеток чайного растения// Физиология растений, 1979, т.26, вып.2, – 449–451 с.
56. Полевой, В. В. Роль ауксина в системах регуляции у растений / В. В. Полевой. –Л., 1986.

57. Третьяков, Д.И. Адвентивная фракция флоры Белоруссии и ее становление / Д.И. Третьяков // Изучение биологического разнообразия методами сравнительной флористики. СПб.: Изд-во СПбГУ, 1998. - С. 250-259.
58. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения). Методические рекомендации ПНД Ф 12.13.1-03 (УТВ. ФГУ «Центр экологического контроля и анализа» 04.09.2003)
59. Расчёт искусственного освещения. Методические указания к выполнению индивидуальных заданий для студентов дневного и заочного обучения всех направлений и специальностей ТПУ. – Томск: Изд. ТПУ, 2008. – 20 с.
60. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.
61. СНиП II-4-79. Естественное и искусственное освещение. Нормы проектирования.-М.: Стройиздат, 1980.- 48 с.
62. Строительные нормы и правила СНиП 23-05-95. Естественное и искусственное освещение (утв. постановлением Минстроя РФ от 2 августа 1995 г. N 18-78) (с изменениями от 29 мая 2003 г.).
63. Технический регламент «О безопасности средств индивидуальной защиты» №1213-ФЗ от 24.12.2009.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

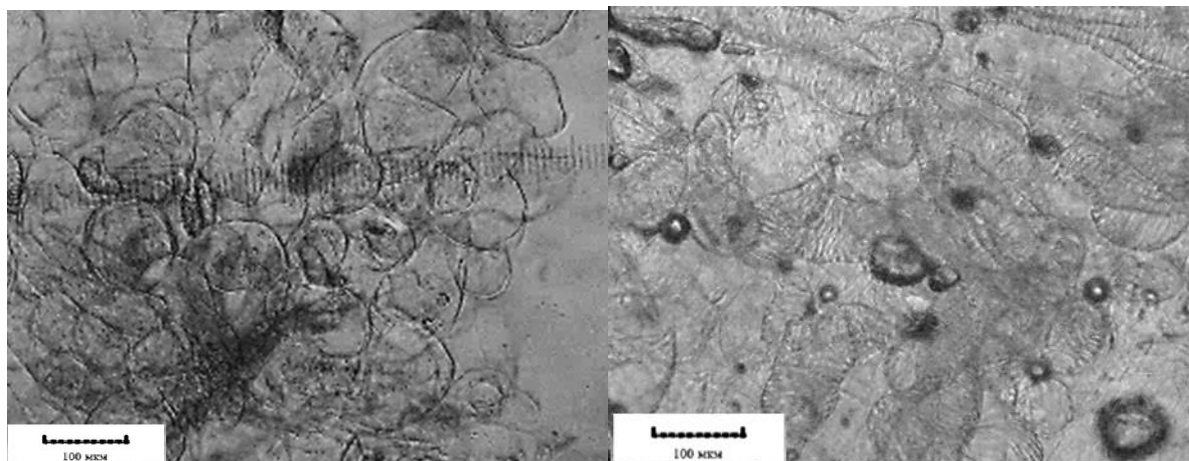


Рисунок 20 – Клетки каллусной ткани растений *Aconitum barbatum* выращенного на среде МС

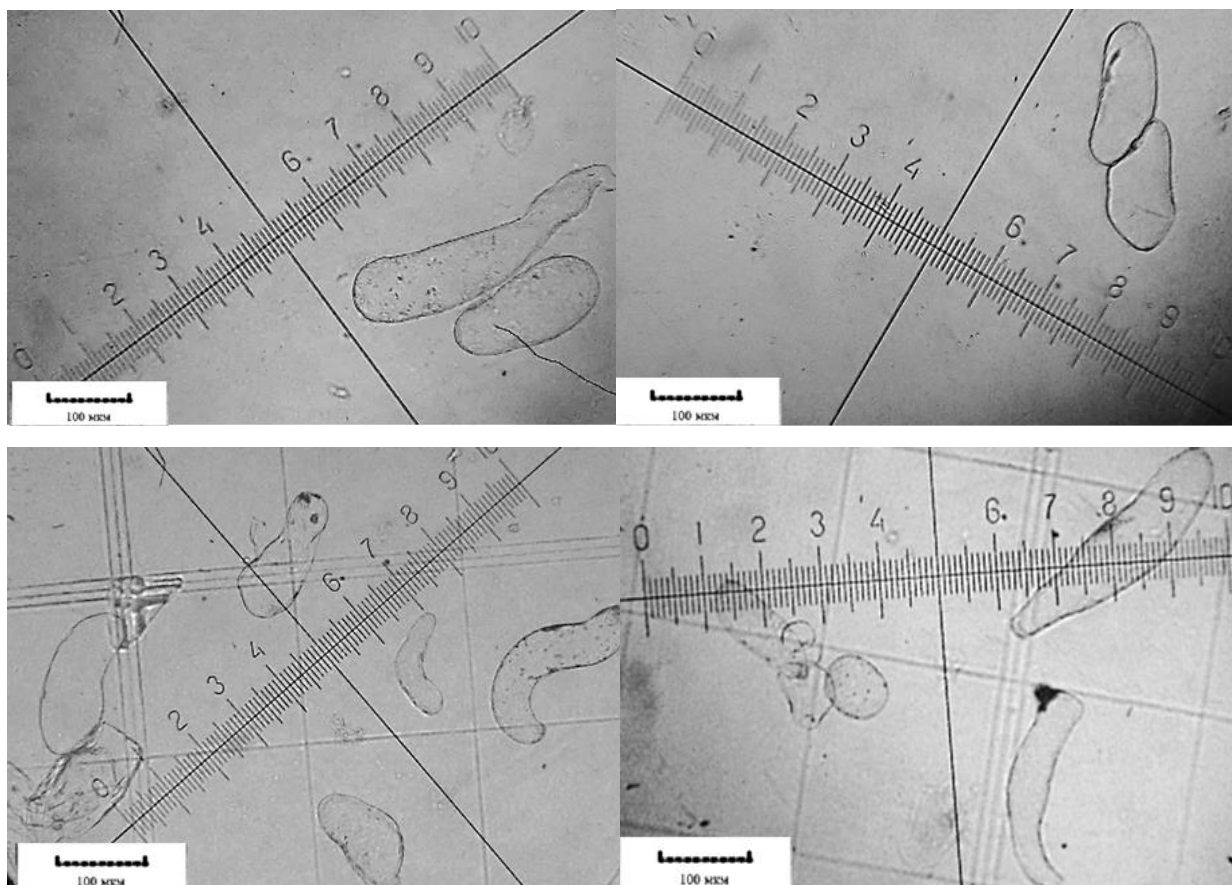


Рисунок 21 – Определение размеров и форм клеток каллусной культуры (преобладают удлиненные клетки)

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

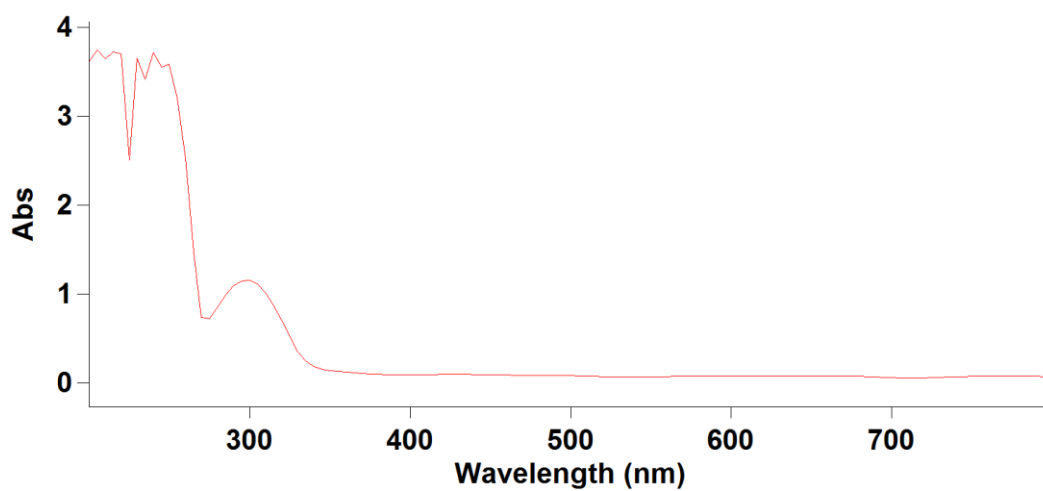


Рисунок 22 – УФ-спектр стандарта лаппаконитина

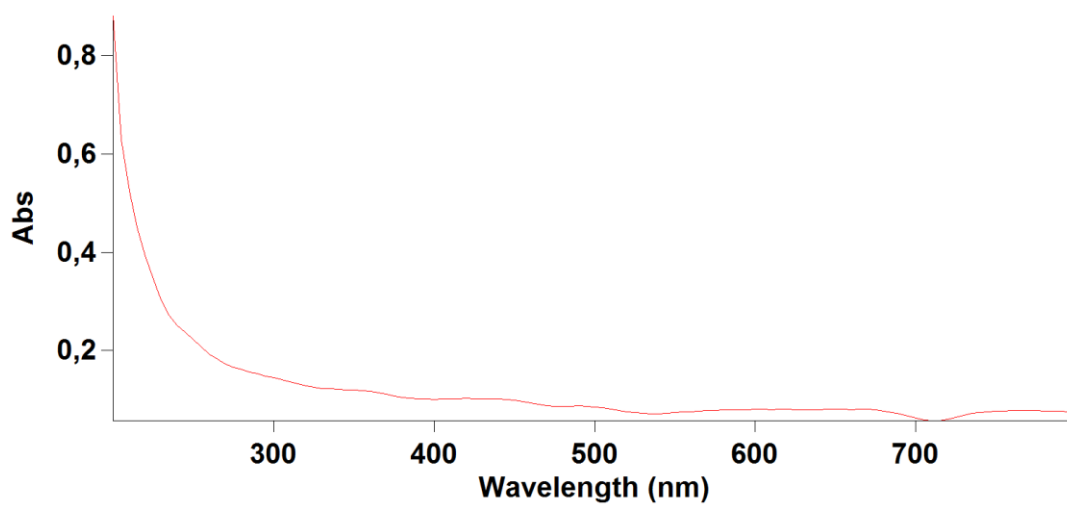
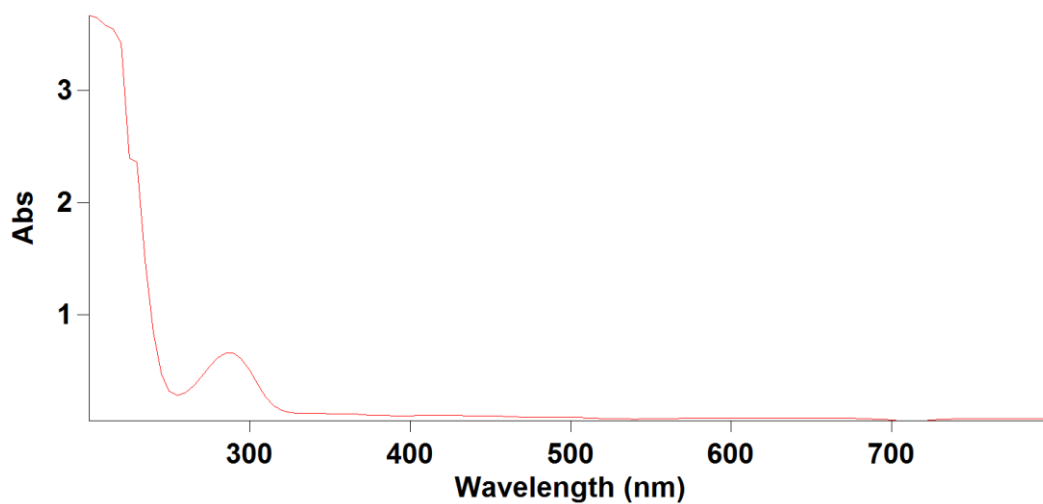


Рисунок 23 – УФ-спектр стандарта зонгорина

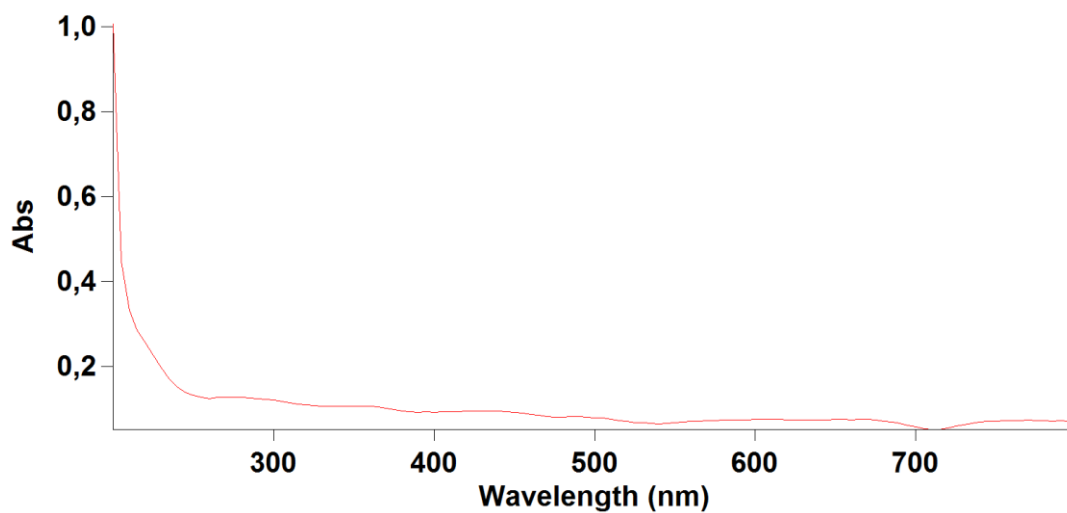


Рисунок 24 – УФ-спектр стандарта напеллина

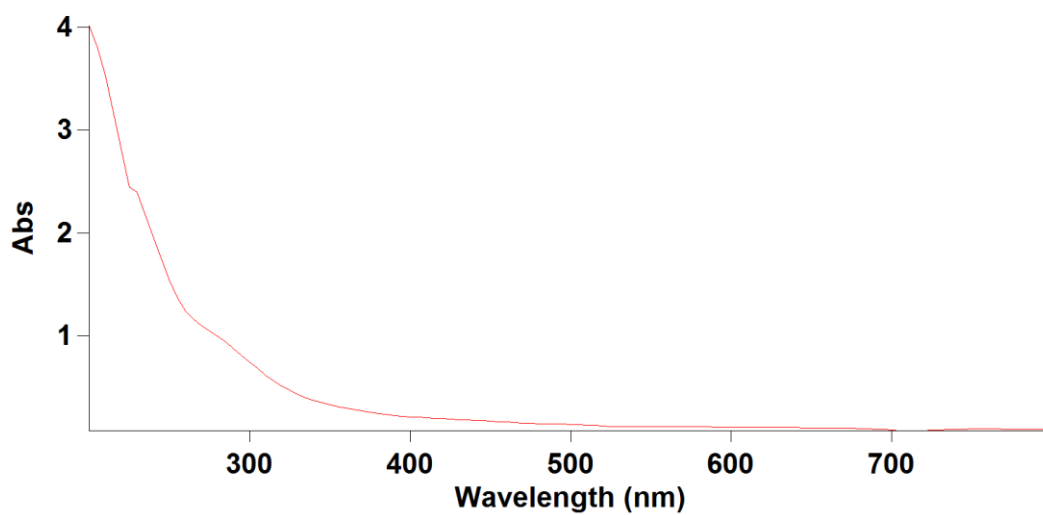
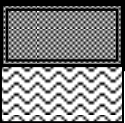


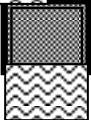





Рисунок 25 – УФ-спектр стандарта N-окись 12-эпинапеллина




ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица 38 - Календарный план-график проведения НИОКР по теме

| № | Вид работ | Исполнитель | Кол. дней | Январь | Февраль | Март | Апрель | Май | Июнь |
|---|--|---------------------------|-----------|---|---|---|--------|-----|------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1 | Выбор направления исследования | Руководитель, Дипломник | 5 |  | | | | | |
| 2 | Составление технического задания | Руководитель | 7 | |  | | | | |
| 3 | Изучение литературы | Дипломник | 15 | | |  | | | |
| 4 | Подбор оптимальных методик и их совершенствование | Дипломник, Руководитель | 5 | | |  | | | |
| 5 | Подготовка исходных материалов | Дипломник | 5 | | |  | | | |
| 6 | Приготовление питательной среды для получения каллусной культуры аконита бородатого. Посадка семян аконита бородатого на питательную среду. | Дипломник Руководитель | 30 | | |   | | | |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | | | | | | | |
|----|--|--|----|---|---|---|---|---|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 7 | Подбор рабочих условий для получения каллусных культур аконита бородатого методом invitro. | Дипломник Руководитель | 15 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | Наблюдение за ростом каллусной культуры. | Дипломник Руководитель | 8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Выделение алкалоидов из каллуса | Руководитель, Дипломник, Инженер | 15 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | Обработка и обсуждение результатов | Дипломник, Руководитель | 8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | Оформление ВКР | Дипломник | 7 | | | | | | | | | | | | | | | |

 Руководитель
 Дипломник
 Инженер